

B2

[Japanese Patent Application No. Hei 7[1995]-207508]

---

Translated from Japanese by the Ralph McElroy Co., Custom Division  
P.O. Box 4828, Austin, Texas 78765 USA

Code: 522-50886

[stamps:] PCT/JP96/00374  
March 18, 1996

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Application Date: July 21, 1995

[stamp:] Received June 10, 1996  
WIPO PCT

Application No.: Patent Application No. Hei 7[1995]-207508

Applicant: Yukijirushi Nyugyo K.K.

[stamp:] PRIORITY DOCUMENT

May 10, 1996

Commissioner,  
Patent Office [signature] [seal:] Yuji Kiyokawa

[footer on each page:] Approval No.: Approval Hei 08[1996]-3027246

Evidence Submission No.: Patent Evidence Submission No.  
Hei 08[1996]-3027246

Document name: Patent application  
Compilation No.: SNMFP95239  
Submission Date: July 21, 1995  
Destination: Mr. Yuji Kiyokawa, Commissioner, Patent Office  
Title of invention: Novel protein and process for the production thereof  
No. of Claims: 10

Inventor:

Address: 456-1 Shimofuruyama, Ishibashi-cho,  
Shimotsuga-gun, Tochigi-ken  
Name: Masaaki [REDACTED]

Inventor:

Address: 622-201 Ishibashi, Ishibashi-cho,  
Shimotsuga-gun, Tochigi-ken  
Name: Hideji [REDACTED]

Inventor:

Address: 5-22-6 Midori, Minamikochi-cho, Kochi-gun,  
Tochigi-ken  
Name: Shin-ichi [REDACTED]

Inventor:

Address: 578-15-3-1 Ishibashi, Ishibashi-cho,  
Shimotsuga-gun, Tochigi-ken  
Name: Kazuki [REDACTED]

**Inventor:**

Address: 3777-4 Shimookamoto, Kochi-cho, Kochi-gun,  
Tochigi-ken  
Name: Fumie Kobayashi

**Inventor:**

Address: 4-17-5 Midori, Minami Kochi-cho, Kochi-gun,  
Tochigi-ken  
Name: Nobuyuki Shioya

**Inventor:**

Address: 1-4-14-107 Kamiyama, Koyama-shi, Tochigi-ken  
Name: Nautaka Yamada

**Inventor:**

Address: 578-15-2-4 Ishibashi, Ishibashi-cho,  
Shimotsuga-gun, Tochigi-ken  
Name: Nobuaki Ueda

**Inventor:**

Address: 3-11-12 Mibu-cho Saiwai-cho, Shimotsuga-gun,  
Tochigi-ken  
Name: Tomonori Morita

**Inventor:**

Address: 1672-1-719 Imafuku, Kawagoe-shi, Saitama-ken  
Name: Shoji Ueda

**Inventor:**

Address: 1769-10 Yamada, Kawagoe-shi, Saitama-ken  
Name: Ryoji Higashio

**Applicant:**

Identification No.: 000006699  
Name: Yukijirushi Nyugyo K.K.  
Representative: Sumio Katayama

**Agent:**

Identification No.: 100090941  
Patent Attorney:  
Name or title: Kiyonari Fujino  
Telephone No.: 3226-6671

**Agent:**

Identification No.: 100105061  
Patent Attorney:  
Name or title: Yoshihiro Kodama  
Telephone No.: 3226-6671

**Priority claim based on prior application:**

Application No.: Patent Application No. Hei 7[1995]-54977  
Application Date: February 20, 1995

**Indication of Charge:**

Payment plan: Advance payment  
Ledger No.: 014834  
Amount of payment: ¥21,000

**List of submitted articles:**

Title of article:	Detailed statement 1
Title of article:	Drawing 1
Title of article:	Summary 1
Title of article:	Receipt 1
Proxy No.:	9406430

Document Name: Detailed statement

Title of the invention: Novel protein and process for the production thereof

**Claims**

1. Protein having the following physicochemical properties and activity inhibiting differentiation and/or maturation of osteoclasts:

(a) Molecular weight (by SDS-PAGE): about 60 kD (under reducing conditions) or about 60 kD and about 120 kD (under nonreducing conditions);

(b) Affinity: showing affinity to cation exchanger and heparin;

(c) Thermal stability: the osteoclast differentiation/maturation inhibition activity is reduced by a thermal treatment at 70°C for 10 min or 56°C for 30 min, and the osteoclast differentiation/maturation inhibition activity is lost by a thermal treatment at 90°C for 10 min;

(d) Amino acid sequence: as an internal amino acid sequence, it has the amino acid sequence of sequence Nos. 1-3 in the sequence table.

2. A protein of Claim 1, produced by human fibroblasts.

3. Process for the production of a protein of Claim 1 or 2, characterized by carrying out cell culture of human fibroblasts and purifying the culture solution using ion-exchange, heparin, affinity and reverse-phase columns to carry out adsorption and elution.
4. A process for the production of a protein of Claim 3, wherein the cell culture is carried out using alumina ceramic chips as a supporter.
5. cDNA coding for an amino acid sequence represented by sequence No. 4 in the sequence table.
6. DNA to be hybridized with cDNA coding for an amino acid sequence represented by sequence No. 4 in the sequence table.
7. cDNA represented by base sequence No. 5 in the sequence table.
8. Protein having expression of cDNA coding for an amino acid sequence represented by sequence No. 4 in the sequence table.
9. Protein having expression of cDNA coding for an amino acid sequence with homology of 80% or higher to an amino acid sequence represented by sequence No. 4 in the sequence table and showing an osteoclast differentiation and/or maturation inhibitory activity.
10. Genetic engineering process for the production of a protein having the following physicochemical properties and showing an osteoclast differentiation and/or maturation inhibitory activity, characterized by using cDNA coding for an amino acid sequence represented by sequence No. 4 in the sequence table as a gene:

(a) Molecular weight (by SDS-PAGE): about 60 kD (under reducing condition) or about 60 kD and about 120 kD (under nonreducing conditions);

(b) Affinity: showing affinity to cation exchanger and heparin;

(c) Thermal stability: the osteoclast differentiation/maturation inhibition activity is reduced by a thermal treatment at 70°C for 10 min or 56°C for 30 min, and the osteoclast differentiation/maturation inhibition activity is lost by a thermal treatment at 90° for 10 min;

(d) Amino acid sequence: as an internal amino acid sequence, it has the amino acid sequence of sequence Nos. 1-3 in the sequence table.

Detailed explanation of the invention

[0001]

Industrial application field

This invention pertains to a novel protein showing an activity inhibiting differentiation and/or maturation of osteoclasts, that is, osteoclast inhibitory factor (OCIF), and a process for the production thereof.

[0002]

Prior art

Absorption and regeneration are always repeated in the case of human bone, and osteoblasts for bone formation and osteoclasts for bone resorption play major roles in this process. As a typical disease caused by abnormal bone metabolism carried out by these cells, osteoporosis has been known. This disease is caused by the function of bone resorption by osteoclasts exceeding that of bone formation by osteoblasts. The mechanism of occurrence of this disease has yet to be fully elucidated, but this disease causes bone pain and bone fractures due to the bone becoming fragile. As the population of elderly increases, this disease causing bedridden elderly patients due to bone fracture has become a problem of society, and the development of a drug for treating this disease has become an urgent task. These bone reduction diseases due to abnormal bone metabolism are hopefully treatable by inhibition of bone resorption, promotion of bone formation or improvement in their balance.

[0003]

Osteogenesis is expected to be promoted by promoting proliferation, differentiation and activation of cells involved in osteogenesis or by inhibiting proliferation, differentiation and activation of cells involved in bone resorption. Interest in physiologically active proteins (cytokines) having such activities has increased in recent years, and research has been actively carried out. As cytokines promoting proliferation or

differentiation of osteoblasts, there are reported cytokines such as fibroblast growth factor (FGF, Rodan, S.B., et al., Endocrinology, Vol. 121, p. 1917, 1987), insulin-like growth factor I (IGF-I, Hock, J.M., et al., Endocrinology, Vol. 122, p. 254, 1988), insulin-like growth factor II (IGF-II, McCarthy, T., et al., Endocrinology, Vol. 124, p. 301, 1989), activin A (Centrella, M., et al., Mol. Cell. Biol., Vol. 11, p. 250, 1991), transforming growth factor- $\beta$  (Noda, M., The Bone, Vol. 2, p. 29, 1988), vasculotropin (Varonique, M., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 199, p. 380, 1994), bone morphogenic proteins (BMPs; BMP-2, Yamaguchi, A., et al., J. Cell. Biol. Vol. 113, p. 682, 1991; OP-1, Sampath, T.K., et al., J. Biol. Chem., Vol. 267, p. 20,532, 1992 and Knutson, R., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 194, p. 1352, 1993), etc.

[0004]

On the other hand, as cytokines inhibiting osteoclast formation, that is, differentiation and/or maturation of osteoclasts, there are reported cytokines such as transforming growth factor- $\beta$  (Chenu, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 85, p. 5683, 1988), interleukin 4 (Kasano, K., et al., Bone-Miner., Vol. 21, p. 179, 1993), etc. Furthermore, as cytokines inhibiting bone resorption by osteoclasts, there are reported cytokines such as calcitonin ([no author given] Bone-Miner., Vol. 17, p.347, 1992), macrophage colony-stimulating factor (Hattersley, G., et al., J. Cell. Physiol., Vol. 137, p. 199, 1988), interleukin 4 (Watanabe, K., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 172, p. 1035, 1990), interferon- $\gamma$

(Gowen, M., et al., J. Bone Miner. Res., Vol. 1, p. 469, 1986), etc.

[0005]

These cytokines are hopeful as drugs for improving bone loss diseases by osteogenesis promotion or bone resorption inhibition, and some of the above cytokines such as insulin-like growth factor I, cytokines of bone morphogenic proteins, etc., have been tested clinically as drugs for improving bone metabolism. Furthermore, calcitonin has been commercially available as a treatment drug or pain-reducing drug for osteoporosis.

[0006]

#### Problems to be solved by the invention

As a presently available drug for treatment of diseases related to bone and shortening the treatment period, there are clinically used drugs, for example, active vitamin D<sub>3</sub>, calcitonin and its derivatives, hormone formulation such as estradiol, etc., ipriflavone or calcium formulation, etc. Treatment using these drugs is not necessarily satisfactory with respect to the effects and treatment results, and it has been desirable to develop a new treatment drug to replace these drugs. As described above, the bone metabolism is adjusted depending on the balance between osteogenesis and bone resorption, and a cytokine inhibiting differentiation/maturation of osteoclasts is hopeful as a drug for treating bone loss diseases such as osteoporosis. Therefore, the problem to be solved by this invention is to provide a novel

osteoclast formation inhibitory factor and an effective process for the production of it.

[0007]

Means to solve the problems

; The inventors of this invention studied diligently the situation described above, and as a result, they found a protein OCIF having an osteoclast inhibitory activity, that is, activity inhibiting differentiation and/or maturation of osteoclasts in a culture solution of human embryonic pulmonary fibroblast cells IMR-90 (ATCC deposition No. CCL186).

Furthermore, they also found that if alumina ceramic chips are used as a supporter of cell culture, it is possible to achieve accumulation of the osteoclast inhibitory factor (OCIF) of the present invention in a high concentration in the culture medium, enabling efficient purification.

In addition, the inventors of the present invention established a method for efficient purification of the above protein OCIF by repeatedly carrying out adsorption and elution of the culture solution with ion-exchange, heparin, affinity and reverse-phase columns in that order.

[0008]

Subsequently, based on the information on the amino acid sequence of the natural protein prepared, cloning of cDNA coding for the protein was successfully carried out. The cloned cDNA was used to establish a genetic engineering process for the

production of a protein showing an osteoclast differentiation and/or maturation inhibitory activity.

This invention pertains to a protein characterized by being of human embryonic pulmonary fibroblast origin, having a molecular weight by SDS-PAGE under reducing conditions of about 60 kD or by SDS-PAGE under nonreducing condition of about 60 kD or about 120 kD, showing affinity with cation-exchange and heparin columns, its activity inhibiting differentiation and/or maturation of osteoclasts being reduced by carrying out a thermal treatment at 70°C for 10 min or 56°C for 30 min and being lost by carrying out a thermal treatment at 90°C for 10 min. The structure of the protein OCIF of this invention is clearly different from those of already known osteoclast inhibitory factors.

Furthermore, this invention also pertains to a process for the production of the above protein OCIF, characterized by culturing human fibroblasts, treating the culture solution over a heparin column, eluting its adsorption fraction, applying it to a anion-exchange column to obtain a nonadsorption fraction which is subsequently applied to a cation-exchange column for adsorption and elution, and furthermore, carrying out purification with heparin, affinity and reverse-phase columns to collect the protein. The column treatment in this invention includes not only allowing the culture solution to be applied simply to a heparin-Sepharose column but also other procedures exhibiting the same effects as those achieved by mixing the culture solution with heparin-Sepharose, etc., by using a batch method and carrying out a column treatment. Furthermore, the affinity column used in this invention is optimally a Cibacron Blue column. As a packing material for this Cibacron Blue column, Sepharose

(cellulose) as a supporter with a pigment Cibacron Blue F3GA bound is used, and this column is conventionally called a blue column.

Furthermore, this invention also pertains to an efficient process for the production of the above protein by carrying out cell culture using alumina ceramic chips as a supporter.

[0009]

The protein OCIF of this invention can be isolated and purified efficiently in a high yield from a culture solution of human fibroblasts. The production of the protein OCIF of this invention from this raw material is carried out using a conventional method for the isolation of a protein substance from a biological material. Namely, the desired protein OCIF is isolated and purified using various procedures to utilize its physical and chemical properties. As a concentration method, there are conventional biochemical processing procedures such as ultrafiltration, lyophilization, salting out, etc. Furthermore, as a purification means, there are various procedures conventionally used for protein procedures such as ion-exchange chromatography, affinity chromatography, gel filtration chromatography, hydrophobic chromatography, reverse-phase chromatography, preparative electrophoresis, etc., and their combination. As a human fibroblast, human embryonic fibroblast IMR-90 (ATCC-CCL186) is optimally used. The culture of human embryonic fibroblast IMR-90 cells used as a raw material is carried out by allowing human embryonic fibroblast IMR-90 cells to be adsorbed on alumina ceramic chips, using a DMEM medium (manufactured by Gibco) with 5% fetal bovine serum added as a

culture medium and carrying out standing culture in a roller bottle for one week to 10 days. Furthermore, at the time of purification, a surfactant, 0.1% CHAPS (3-[3-cholamidopropyl-dimethylammonio]-1-propanesulfonate) is desirably added.

[0010]

The specific purification method for the protein OCIF of this invention is as follows. First, a culture solution is applied to a heparin column (heparin Sepharose CL-6B, manufactured by Pharmacia Co.), it is eluted with a 10mM Tris-HCl buffer solution at pH 7.5 containing 2M NaCl to obtain a heparin-adsorbed OCIF fraction, which is applied to a Q anion-exchange column (HiLoad-Q/FF, manufactured by Pharmacia Co.) to obtain a nonadsorption fraction, and the fraction obtained is a heparin adsorptive and basic OCIF fraction. The OCIP active fraction obtained is purified by applying to an S cation-exchange column (Hi Load-S/HP, manufactured by Pharmacia), heparin column (heparin-5PW, manufactured by Toso Co.), Cibacron Blue column (Blue-5PW, manufactured by Toso Co.), reverse-phase column (BU-300C4, manufactured by Perkin Elmer Co.), and the substance isolated is specified by the properties described above.

[0011]

Furthermore, this invention pertains to a process for obtaining a protein OCIF showing an osteoclast differentiation and/or maturation inhibitory activity by cloning cDNA coding for

the protein based on the amino acid sequence of the natural protein prepared as described above and using this cDNA cloned in a genetic engineering method. Specifically, the OCIF protein purified according to the above method of this invention is treated with an endoprotease (for example, lysyl endopeptidase), the peptides formed are used for amino acid sequence determination, and an oligonucleotide mixture coding for the results of this internal amino acid sequence determination is prepared.

Subsequently, the prepared oligonucleotide mixture is used as a primer, and the PCR method (preferably RT-PCR method) is used to obtain OCIF cDNA fragment. This prepared OCIF cDNA fragment is used as a probe, and the entire cDNA of OCIF is cloned from a cDNA library. The prepared OCIF cDNA is inserted into an expression vector to prepare an OCIF expression plasmid, which is introduced into various bacteria or microorganism strains for expression, and as a result, it is possible to obtain recombinant OCIF.

[0012]

Furthermore, the OCIF activity is measured according to the method of Masayoshi Kumegawa, et al. (Tanpakushitsu, Kakusan, Koso, Vol. 34, p. 999, 1989) and Takahashi, N., et al. (Endocrinology, Vol. 122, p. 1373, 1988). Specifically, the target cell used was a bone marrow cell of 17-day-old mouse, and the osteoclast formation inhibition was measured in the presence of active vitamin D<sub>3</sub> (calcitriol) using inhibition of the induction of tartaric acid-resistant acid phosphatase activity.

[0013]

The protein of this invention, osteoclast inhibitory factor, is useful as a drug for treatment or improvement in bone loss diseases such as osteoporosis, etc., and other abnormal bone metabolism diseases as well as an antigen to establish immunological diagnostic means for these diseases. The protein of this invention can be administered orally or nonorally after formulation. Specifically, the formulation containing the protein of this invention can be safely administered to humans as a drug composition containing the osteoclast inhibitory factor of this invention as an effective active component.

As a type of drug composition, there are [intramuscular] injection composition, intravenous injection composition, suppository, nasal spray, sublingual tablet, percutaneous absorption drug, etc. In the case of an injection composition, a pharmacologically effective amount of the osteoclast inhibitory factor of this invention is mixed with a pharmaceutically permitted carrier, and excipients/activators such as amino acids, saccharides, cellulose derivatives and other conventionally used organic/inorganic compounds added to injection compositions may be used. Furthermore, in the case of preparation of injection formulations using the osteoclast inhibitory factor of this invention and these excipients/activators, pH adjuster, buffer, stabilizer, solubilizer, etc., may be added using conventional procedures to obtain injection formulations.

[0014]

Application Example 1

This invention is explained specifically in detail by using application examples as follows, but they are merely examples and this invention is not restricted by these examples at all.

**Preparation of human fibroblast IMR-90 cell culture solution**

Human embryonic fibroblast IMR-90 cells (ATCC-CCL186) were cultured in a roller bottle (490 cm<sup>2</sup>, 110 x 171 mm, manufactured by Corning) by allowing it to be adsorbed on 80 g of alumina ceramic chips (99.5% of alumina, manufactured by Toshiba Ceramics Co.) For the actual culture 60 roller bottles were used, 500 mL of 10mM HEPES buffer-added DMEM medium (Gibco-BRL Co.) with 5% calf serum added were used per bottle, and standing culture was carried out at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> for 7-10 days. After culture, the culture solution was recovered, fresh culture medium was added, and 30 L of an IMR-90 culture solution were prepared by single culture. The culture solution obtained was called Sample 1.

[0015]

**Osteoclast inhibitory activity measurement method**

For measuring the activity of the protein osteoclast inhibitory factor of the present invention, the method of Masayoshi Kumegawa, et al., (Tanpakushitsu, Kakusan, Koso, Vol.

34, p. 999, 1989) and Takahashi, N., et al. (Endocrinology, Vol. 122, p. 1373, 1988) was used. Namely, the osteoclast formation in 17-day-old mouse bone marrow cells in the presence of active vitamin D<sub>3</sub> was tested by induction of tartaric acid-resistant acid phosphatase activity, and its inhibition activity was measured. Specifically, 100  $\mu$ L of a sample diluted with an  $\alpha$ -MEM medium (Gibco BRL) containing  $2 \times 10^{-8}$ M active vitamin D<sub>3</sub> and 10% fetal bovine serum were placed in a 96-well microplate,  $3 \times 10^5$  17-day-old mouse bone marrow cells suspended in 100  $\mu$ L of the  $\alpha$ -MEM medium with 10% of fetal bovine serum added were inoculated and cultured at 37°C and 100% humidity with 5% CO<sub>2</sub> for one week. On the 3rd day and 5th day of culture, 160  $\mu$ L of the culture solution were discarded, and 160  $\mu$ L of a sample diluted with the  $\alpha$ -MEM medium containing  $1 \times 10^{-8}$ M active vitamin D<sub>3</sub>, and 10% fetal serum bovine were added. After the 7th day of culture, the cells were washed with a phosphate-buffered physiological saline solution, fixed with ethanol/acetone (1:1) at room temperature for 1 min, and the osteoclast cell formation was detected by staining, using a tartaric acid-resistant acid phosphatase activity measurement kit (acid phosphatase, leukocyte, catalog No. 387-A, Sigma). The reduction in the acid phosphatase activity-positive cells in the presence of tartaric acid was considered to be the OCIF activity.

[0016]

#### OCIF purification

##### i) Purification with heparin Sepharose CL-6B

About 90 L of IMR-90 culture solution (Sample 1) were filtered through a 0.22- $\mu$ m filter (hydrophilic millidisc, 2000 cm<sup>2</sup>, Millipore) and applied in 3 aliquot to 80-mL column heparin Sepharose CL-6B (5 x 4.1 cm) equilibrated with 10mM Tris-HCl buffer solution (called Tris-HCl, below) at pH 7.5 containing 0.3M NaCl. After washing with 10mM Tris-HCl at pH 7.5 at a flow rate of 500 mL/h, elution was carried out with 10mM Tris-HCl/2M NaCl at pH 7.5 to obtain 900 mL of a heparin Sepharose CL-6B adsorption fraction which was called Sample 2.

[0017]

##### ii) Purification with HiLoad-Q/FF

The heparin Sepharose adsorption fraction (Sample 2) was dialyzed against 10mM Tris-HCl at pH 7.5, CHAPS was added to 0.1%, and the solution was allowed to stand overnight at 4°C. Subsequently, it was applied in two aliquot to an anion-exchange column (HiLoad-Q/FF, 2.6 x 10 cm, Pharmacia) equilibrated with 0.1% CHAPS-added 50mM Tris-HCl at pH 7.5 to obtain 1000 mL of a nonadsorption fraction which was called Sample 3.

[0018]

(iii) Purification with HiLoad-S/HP

The HiLoad-Q nonadsorption fraction (Sample 3) was applied to a cation-exchange column (HiLoad-S/HP, 2.6 x 10 cm, Pharmacia) equilibrated with 50mM Tris-HCl/0.1% CHAPS at pH 7.5. After washing with 0.1% CHAPS-added 50mM Tris-HCl at pH 7.5, elution was carried out using linear gradient to obtain an NaCl concentration of 1M by taking 100 min at a flow rate of 8 mL/min, and the eluent was fractionated to fractions of 12 mL/fraction. Ten fractions each of the fractions 1-40 were combined to obtain 4 combined fractions, 100  $\mu$ l each of which were used to measure OCIF activity. The OCIF activity was observed in fractions 11-30 (Figure 1, in the figure, ++ shows an activity of 80% or more inhibition of osteoclast generation, + shows an activity of 30-80% inhibition of osteoclast generation, and - shows no activity detected). A combined fraction of fractions 21-30 showing a higher relative activity was selected to be Sample 4.

[0019]

iv) Affinity column (heparin-5PW) purification

After 120 mL of Sample 4 were diluted with 240 mL of 0.1% CHAPS-added 50mM Tris-HCl at pH 7.5, the solution was applied to an affinity column (heparin-5PW, 0.8 x 7.5 cm, Toso) equilibrated with 0.1% CHAPS-added 50mM Tris-HCl at pH 7.5. After washing with a 0.1% CHAPS-added 50mM Tris-HCl at pH 7.5, elution was carried out using linear gradient to obtain an NaCl concentration of 2M

by taking 60 min at a flow rate of 0.5 mL/min, and the eluent was fractionated to fractions of 0.5 mL/fraction. Subsequently, 50  $\mu$ L of each fraction were used to measure OCIF activity, and 10 mL of an OCIF active fraction eluted with about 0.7-1.3M of NaCl were obtained and called Sample 5.

[0020]

v) Affinity column (Blue-5PW) purification

After 10 mL of Sample 5 were diluted with 190 mL of a 0.1% CHAPS-added 50mM Tris-HCl at pH 7.5, the solution was applied to an affinity column (Blue-5PW, 0.5 x 7.50 cm, Toso) equilibrated with a 0.1% CHAPS-added 50mM Tris-HCl at pH 7.5. After washing with 0.1% CHAPS-added 50mM Tris-HCl at pH 7.5, elution was carried out using linear gradient to obtain an NaCl concentration of 2M by taking 60 min at a flow rate of 0.5 mL/min, and the eluent was fractionated to fractions of 0.5 mL/fraction. Subsequently, 25  $\mu$ L of each fraction were used to measure OCIF activity, and OCIF active fractions 49-70 eluted with about 1.0-1.6M NaCl were obtained (Figure 2, in the figure + shows an OCIF activity, and ++ shows an especially high OCIF activity).

[0021]

vi) Reverse-phase column purification

After 10  $\mu$ L of 25% TFA (trifluoroacetic acid) were added to 1 mL each of the fractions 49-50 obtained, the mixture was applied to a reverse-phase column (BU-300, C4, 2.1 x 220 mm,

Perkin-Elmer) equilibrated with 0.1% TFA-added 25% acetonitrile. Elution was carried out using a linear gradient to make an acetonitrile concentration to 55% by taking 60 min at a flow rate of 0.2 mL/min and each peak was fractionated (Figure 3). Subsequently, 100  $\mu$ L of each peak fraction were used to measure OCIF activity, and the concentration-dependent activity was detected in peaks 6 and 7. The results are shown in Table I

[0022]

[Table I]

OCIF activity of fractions from a reverse-phase column

① 希釈率	1/40	1/120	1/360	1/1080
②  ピーク 6	++	++	+	-
③  ピーク 7	++	+	-	-

Key: 1 Dilution rate  
 2 Peak 6  
 3 Peak 7

(In the table, ++ shows an activity of 80% or higher inhibition of osteoclast formation, + shows an activity of 30-80% inhibition of osteoclast formation, and - shows no activity detected.)

[0023]

OCIF molecular weight measurement

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing or nonreducing conditions was carried out using the OCIF-active peak 6 and peak 7 in the amount of 40  $\mu$ L each. Specifically, 20  $\mu$ L each of each peak fraction were placed in two tubes for vacuum concentration, subsequently dissolved in 1.5  $\mu$ L of a mixture of 10mM Tri-HCl at pH 8 containing 1mM EDTA, 2.5% SDS and 0.01% bromophenol blue, the solution was allowed to stand at 37°C overnight under reducing conditions (5% 2-mercaptoethanol added) or nonreducing conditions, and subsequently, 1  $\mu$ L was loaded for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis was carried out using 10-15% acrylamide gradient gel (Pharmacia) and electrophoresis device Phast System (Pharmacia). As a molecular weight marker, phosphorylase b (94 kD), bovine serum albumin (67 kD), ovalbumin (43 kD), carbonic anhydrase (30 kD), trypsin inhibitor (20.1 kD) and  $\alpha$ -lactalbumin (14.4 kD) were used. After electrophoresis, a Phast Gel Silver Stain kit (Pharmacia) was used for silver staining. The results obtained are shown in Figure 4.

[0024]

As a result, a protein band of about 60 kD under reducing or nonreducing condition was observed for peak 6. Furthermore, for peak 7, bands of about 60 kD under reducing conditions and about 120 kD under nonreducing conditions were detected. Therefore,

peak 7 is considered to represent a homodimer of the protein of peak 6.

[0025]

#### OCIF thermal stability test

A sample was prepared by taking 20  $\mu$ L each from the Blue-5PW fractions 51 and 52 and adding 30  $\mu$ L of 10mM phosphate-buffered physiological saline solution at pH 7.2, and a thermal treatment at 70 or 90°C for 10 min or 56°C for 30 min was carried out. The same method as that described above was used to measure OCIF activity for the sample after thermal treatment. Table II shows the results.

[0026]

[Table III]

#### OCIF thermal stability

① 希釈率	1/300	1/900	1/2700	
② 未処理	++	+	-	
③ 70°C 10分	+	-	-	
④ 56°C 30分	+	-	-	
⑤ 90°C 10分	-	-	-	

Key: 1 Dilution rate  
2 No treatment  
3 70°C for 10 min  
4 56°C for 30 min  
5 90°C for 10 min

(In the table, ++, + and - mean same as those described in Table I.)

[0027]

(5) [sic; no (1)-(4) found prior to this] Internal amino acid sequence determination

For the Blue-5PW fractions 51-70, 2 fractions were combined to form a combined fraction, 1 mL of which was mixed with 10  $\mu$ L of 25% TFA and applied to a reverse-phase column (BU-300, C4, 2.1 x 220 mm, Perkin-Elmer) equilibrated with 0.1% TFA-added 25% acetonitrile. Thus, 1 mL each was applied 10 times for all samples. Elution was carried out using linear gradient to make an acetonitrile concentration to 55% by taking 60 min at a flow rate of 0.2 mL/min, and peak 6 and peak 7 were collected. For portions of peak 6 and peak 7 obtained, N-terminal amino acid sequence analysis was carried out respectively by using a protein sequencer (Model Procise [transliteration] 494, Perkin-Elmer), but the analysis was impossible, implying the possibility of the N-terminus being blocked for those proteins. Therefore, the internal amino acid sequence was analyzed for those proteins. Specifically, peak 6 and peak 7 were concentrated respectively by carrying out centrifugation and reduced by adding 50  $\mu$ L of 0.5M Tris-HCl at pH 8.5 containing 100  $\mu$ g of dithreitol, 10mM EDTA,

7M guanidine hydrochloride and 1% CHAPS and allowing the mixture to stand at room temperature for 4 h. Subsequently, 0.2  $\mu$ L of 4-vinylpyridine were added, and the mixture was allowed to stand at room temperature in the dark overnight to carry out the reaction to form a pyridylethyl derivative. To the sample prepared, 1  $\mu$ L of 25% TFA was added, the mixture was applied to a reverse-phase column (BU-300, C4, 2.1 x 30 mm, Perkin-Elmer) equilibrated with 0.1% TFA-added 20% acetonitrile. Elution was carried out using a linear gradient to make the acetonitrile concentration to 50% by taking 30 min at a flow rate of 0.3 mL/min to obtain a reduced pyridylethylated sample. The reduced pyridylethylated sample was concentrated by centrifugation, dissolved in 25  $\mu$ L of 0.1M Tris-HCl at pH 9 containing 8M urea and 0.1% Tween 80, diluted subsequently with 73  $\mu$ L of 0.1M Tris-HCl at pH 9, and the reaction was carried out at 37°C for 15 h by adding 0.02  $\mu$ g of AP1 (lysyl endoprotease, Wako Pure Chemical). To the reaction mixture, 1  $\mu$ L of 25% TFA was added, the mixture was applied to a reverse-phase column (RP-300, C8, 2.1 x 220 mm, Perkin-Elmer) equilibrated with 0.1% TFA, and the elution was carried out using a linear gradient to make the acetonitrile concentration to 50% by taking 70 min at a flow rate of 0.2 mL/min to obtain peptide fragments (Figure 5). The amino acid sequence analysis was carried out for the peptide fragments obtained (P1-P3) by using the protein sequencer. The results are shown in the sequence table, sequence Nos. 1-3.

[0028]

(6) Determination of cDNA sequence

i) Isolation of poly(A)<sup>+</sup> RNA from IMR-90 cells

Poly(A)<sup>+</sup> RNA of IMR-90 cells was isolated using a Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen) and its manual. By using this method, about 10 µg of poly(A)<sup>+</sup> RNA were obtained from  $1 \times 10^8$  IMR-90 cells.

[0029]

ii) Mixed primer preparation

Based on the amino acid sequences of peptides prepared before (Sequence Nos. 2 and 3 in the sequence table), the following two kinds of mixed primers were synthesized. Specifically, an oligonucleotide mixture having all base sequences capable of coding 6th (Gln) to 12th (Leu) amino acids of peptide P2 (mixed primer No. 2F) was synthesized. Furthermore, a complementary oligonucleotide mixture to all base sequences capable of coding the 6th (His) to 12th (Lys) amino acids of peptide P3 (mixed primer No. 3R) was also synthesized. The base sequences of the mixed primers Nos. 2F and 3R are shown as follows.

[0030]

No. 2F:

5'-CAAGAACAAACTTTCAATT-3'

G G G C C GC

A

G

[0031]

No. 3R:

5'-TTTATACATTGTAAAAGAATG-3'

C G C G GCTG

A C

G T

[0032]

### iii) PCR Amplification of OCIF cDNA fragment

As a template, 1 µg of poly(A)<sup>+</sup> RNA prepared in (6)-i) was used. A single-chain cDNA was prepared by using a Superscript II cDNA synthesis kit (Gibco BRL) and protocol of the company, and PCR was carried out using the synthesized cDNA and primer prepared in (6)-ii) to obtain an OCIF cDNA fragment. The following components were used.

10X Ex Taq buffer (Takara Shuzo)	5	µL
2.5mM dNTP	4	µL
cDNA solution	1	µL
Ex Taq (Takara Shuzo)	0.25	µL
Distilled water	29.75	µL
40µM primer No. 2F	5	µL
40µM primer No. 3R	5	µL

The above solution was placed in a microcentrifuge tube, mixed, and the following procedures were used to carry out PCR. Specifically, after a pretreatment at 95°C for 3 min, the reaction in three stages, that is, 95°C for 30 sec, 50°C for 30 sec and 70°C for 2 min was carried out repeatedly 30 times, and the reaction mixture was subsequently retained at 70°C for 5 min. A portion of the reaction mixture was applied to agarose gel for electrophoresis and confirmed to obtain a uniform DNA fragment of about 400 bp.

[0033]

(7) Cloning of PCR-amplified OCIF cDNA fragment and base sequence determination

The DNA fragment prepared in (6)-iii) was inserted in a Bluescript vector (pBluescript II sk<sup>-</sup>, Strategene), and the transformation of *E. coli* DH5  $\alpha$  (Gibco BRL) was carried out. The transformed strain was cultured, and a plasmid with the OCIF cDNA fragment of about 400 bp inserted was purified by using conventional procedures. The base sequence of OCIF cDNA inserted in the plasmid obtained was determined by using a Taq Dye Deoxy

Terminator Cycle Sequencing kit, Perkin-Elmer). An amino acid sequence comprising 132 amino acids predicted from the base sequence was found to contain the internal amino acid sequences of OCIF (sequence Nos. 2 and 3 in the sequence table) used to design the mixed primer at the N-terminus and C terminus, respectively. Furthermore, the internal amino acid sequence (sequence No. 1) of OCIF was also found in the amino acid sequence comprising 132 amino acids. From those results obtained, the cloned cDNA of about 400 bp was confirmed to be the OCIF cDNA fragment.

[0034]

(8) DNA probe preparation

The plasmid prepared in (7) with an OCIF cDNA fragment of about 400 bp inserted was used as a template to carry out PCR under the conditions of (6)-iii) and to amplify the OCIF cDNA fragment. Subsequently, agarose gel electrophoresis was carried out to obtain an OCIF cDNA fragment of about 400 bp. The DNA prepared was labeled with [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP by using a Megaprime DNA Labeling kit (Amersham), and it was used as a probe for screening the entire OCIF cDNA.

[0035]

(9) cDNA library preparation

As a template 2.5  $\mu\text{g}$  of poly(A)<sup>+</sup> RNA prepared in (6)-i) were used. A Great Length cDNA synthesis kit (Clonetech) and its

protocol were used to carry out cDNA synthesis using an oligo(dT) primer, EcoRI-SalI-NotI adapter addition and cDNA size fractionation, and after ethanol precipitation, the product was dissolved in 10 µL TE buffer solution. Subsequently, 0.1 µg of the adaptor-added cDNA prepared was inserted into 1 µg of λZAP express vector (Strategene) previously digested with EcoRI using T4 DNA ligase. The cDNA recombinant phage DNA solution prepared was used for the in vitro packaging reaction using Gigapack Gold II (Strategene) to obtain a λZAP express recombinant phage.

[0036]

(10) Recombinant phage screening

*E. coli*, XL1-Blue MRF' (Strategene) was infected with the recombinant phage prepared in (9) at 37°C for 15 min, added to a 0.7% agar-containing NZY medium heated at 50°C, and the mixture was poured into an NYZ agar medium plate. After overnight culture at 37°C, a High Bond N [filter] (Amersham Co.) was allowed to come into close contact with a plate having a formed plaque for about 30 sec. The filter was alkali-modified using conventional procedures, neutralized, and after dipping in a 2X SSC solution, the DNA was fixed on the filter with UV Cross Link (Strategene). The prepared filter was pretreated at 65°C by soaking in a 100 µg/mL salmon sperm DNA-containing hybridization buffer (Amersham) for 4 h. Subsequently, it was transferred to the above buffer with the thermally modified above DNA probe ( $2 \times 10^5$  cpm/mL) added to carry out hybridization overnight at 65°C. After the reaction, the filter was washed 2 times with 2X SSC and 2 times with 0.1X SSC and 0.1% SDS solution,

respectively, at 65°C for 10 min. Several positive clones obtained were purified by carrying out screening twice. A clone among them having an approximately 1.6-kb insert was used for the following procedures. *E. coli* XL1-Blue MRF' was infected with the purified phage by using a λZAP express cloning kit (Stratagene) and its protocol, subsequently, multiple infection was carried out with a helper phage ExAssist (Stratagene); *E. coli* XLOLR (Stratagene) was infected with the culture supernatant, and subsequently, a kanamycin-resistant strain was collected to obtain a transformed strain having a plasmid with the above insert of approximately 1.6 kb inserted in pBKCMV (Stratagene). This transformant was deposited as FERM P-14998 at the Life Science Technology Research Institute, Bureau of Industrial Technology, Ministry of International Trade and Industry. The transformant having the plasmid was cultured to isolate and purify the plasmid using conventional procedures.

[0037]

(11) Determination of the base sequence of cDNA coding for the total amino acid sequence of OCIF

The base sequence of OCIF cDNA prepared in (10) was determined by using a Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer). The primers used were T3, T7 primer (Stratagene) and synthetic primers designed based on the base sequence of OCIF cDNA are as follows.

T3: 5' -AATTAACCCCTCACTAAAGGG-3'  
T7: 5' -GTAATACGACTCACTATAAGGGC-3'  
IF1: 5' -ACATCAAAACAAAGACCAAG-3'  
IF2: 5' -TCTTGCTTGTTTTGTGATG-3'  
IF3: 5' -TTATTGCCACAAACTGAGC-3'  
IF4: 5' -TTGTGAAGCTGTGAAGGAAC-3'  
IF5: 5' -GCTCAGTTGTGGCGAATAA-3'  
IF6: 5' -GTGGGAGCAGAACATTGA-3'  
IF7: 5' -AATGAACAACTTGCTGTGCT-3'  
IF8: 5' -TGACAAATGTCCCTCGGTA-3'  
IF9: 5' -AGGTAGGTACCAGGAGGACA-3'  
IF10: 5' -GAGCTGCCCTCCTGGATTG-3'  
IF11: 5' -CAAACTGTATTCGCTCTGG-3'  
IF12: 5' -GTGTGAGGGAGGCATTCTTCA-3'

The OCIF base sequence determined is shown as sequence No. 5, and the amino acid sequence estimated from it is shown as sequence No. 4.

[0038]

(12) Preparation of OCIF cDNAn expression plasmid

The plasmid prepared in (10) having OCIF cDNA of approximately 1.6 kb inserted was digested with restriction enzymes BamHI and XhoI to cut out OCIF cDNA which was isolated by agarose gel electrophoresis and purified by using a QIAEX DNA isolation kit. The OCIF cDNA was inserted in an expression plasmid pCEP4 (Invitrogen) digested, in advance, with restriction enzymes BamHI and XhoI using a ligation kit (Takara Shuzo) to carry out transformation of *E. coli* DH5  $\alpha$  (Gibco BRL). The transformed strain obtained was cultured, and an expression plasmid with OCIF cDNA inserted was purified by using a Quiagen column (Quiagen). The OCIF expression plasmid was allowed to precipitate using ethanol dissolved in sterile distilled water to be used in the following procedures.

[0039]

(13) OCIF cDNA transient expression and its activity measurement

The OCIF expression plasmid prepared in (12) was used for expression of recombinant OCIF using the following method, and the activity was measured. In each well of a 6-well plate,  $8 \times 10^5$  293/EBNA cells (Invitrogen) were inoculated using a 10% fetal bovine serum (Gibco BRL)-containing IMDM medium (Gibco BRL). The next day, the medium was removed, and the cells were washed with a no serum-added IMDM medium. A transfection reagent, Lipofectamine (Gibco BRL) and attached protocol were used. The

OCIF expression plasmid diluted, in advance, using an OPTI-MEM medium (Gibco BRL) and lipofectamine were mixed, and subsequently, the mixture was added to cells in each well. The amount of the expression plasmid and lipofectamine used were 3  $\mu$ g and 12  $\mu$ L, respectively. After 38 h, the medium was removed, and 1 mL of fresh OPTI-MEM medium was added. After 30 h, the medium was recovered, and it was used as an OCIF activity measurement sample. The OCIF activity measurement was carried out as follows. The osteoclast formation in a 17-day-old mouse bone marrow cells in the presence of active vitamin D<sub>3</sub> was tested using induction of tartaric acid-resistant acid phosphatase activity, and the inhibition activity was measured as an OCIF activity. Specifically, 100  $\mu$ L of a sample diluted with an  $\alpha$ -MEM medium (Gibco BRL) containing  $2 \times 10^{-8}$ M active vitamin D<sub>3</sub>, and 10% fetal bovine serum were placed in a 96-well microplate,  $3 \times 10^5$  17-day-old mouse bone marrow cells suspended in 100  $\mu$ L of the  $\alpha$ -MEM medium with 10% of fetal bovine serum added were inoculated and cultured at 37°C and 100% humidity with 5% CO<sub>2</sub> for one week. On the 3rd day and 5th day of culture, 160  $\mu$ L of the culture solution were discarded, and 160  $\mu$ L of a sample diluted with the  $\alpha$ -MEM medium containing  $1 \times 10^{-8}$ M active vitamin D<sub>3</sub>, and 10% fetal bovine serum were added. After the 7th day of culture, the cells were washed with a phosphate-buffered physiological saline solution, fixed with ethanol/acetone (1:1) at room temperature for 1 min and the osteoclast cell formation was detected by staining using a tartaric acid-resistant acid phosphatase activity measurement kit (acid phosphatase, leukocyte, catalog No. 387-A, Sigma). The reduction in the acid phosphatase activity-positive cells in the presence of tartaric acid was considered to be the OCIF activity. As apparent from the

results shown in Table III, it was confirmed to have the same activity as that of natural OCIF prepared from an IMR-90 culture solution.

[0040]

[Table III]

OCIF activity in culture solution of 293/EBNA cells

	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
① 希釈率	—	—	—	—	—	—	—
② OCIF	—	—	—	—	—	—	—
③ 遺伝子導入	++	++	++	++	++	+	-
④ ベクター導入	-	-	-	-	-	-	-
⑤ 未処理	-	-	-	-	-	-	-

Key: 1 Rate of dilution  
 2 Gene introduced  
 3 Vector introduced  
 4 No treatment

(In the table, ++ shows an activity of 80% or more inhibition of osteoclast generation, + shows an activity of 30-80% inhibition of osteoclast generation, and - shows no activity detected.)

[0041]

#### Effects of the invention

This invention provides a novel protein having an osteoclast cell formation inhibition activity and efficient process for the production of it. The protein of this invention shows an osteoclast inhibitory activity, and it is useful as a drug for treating bone loss diseases such as osteoporosis, etc., or antigen for immunological diagnoses of these diseases.

[0042]

#### Sequence table

Sequence No.: 1

Sequence length: 6

Sequence type: amino acid

No. of chains: 1

Topology: linear chain

Kind of sequence: peptide (internal amino acids of protein)

Sequence:

Xaa Tyr His Phe Pro Lys

1

5

[0043]

Sequence No.: 2

Sequence length: 14

Sequence type: amino acid

No. of chains: 1

Topology: linear chain

Kind of sequence: peptide (internal amino acids of protein)

Sequence:

Xaa Gln His Ser Xaa Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Xaa Lys

1

5

10

[0044]

Sequence No.: 3

Sequence length: 12

Sequence type: amino acid

No. of chains: 1

Topology: linear chain

Kind of sequence: peptide (internal amino acids of protein)

Sequence:

Xaa Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys

1

5

10

[0045]

Sequence No.: 4

Sequence length: 401

Sequence type: amino acid

No. of chains: 1

Topology: linear chain

Kind of sequence: protein

Sequence:

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser  
1 5 10 15  
Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His  
20 25 30  
Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro  
35 40 45  
Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr  
50 55 60  
Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His  
65 70 75  
Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu  
80 85 90  
Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys  
95 100 105  
Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys  
110 115 120  
His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr  
125 130 135  
Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe

140	145	150
<b>Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn</b>		
155	160	165
<b>Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr</b>		
170	175	180
<b>His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys</b>		
185	190	195
<b>Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala</b>		
200	205	210
<b>Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp</b>		
215	220	225
<b>Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile</b>		
230	235	240
<b>Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys</b>		
245	250	255
<b>Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile</b>		
260	265	270
<b>Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile</b>		
275	280	285
<b>Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu</b>		
290	295	300
<b>Ser Leu Pro Gly Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr</b>		
305	310	315
<b>Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser</b>		
320	325	330
<b>Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu</b>		
335	340	345
<b>Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr</b>		
350	355	360

Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe			
	365	370	375
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly			
	380	385	390
Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu			
	395	400	

[0046]

Sequence No.: 5  
Sequence length: 1206  
Sequence type: nucleic acid  
No. of chains: 1  
Topology: linear chain  
Kind of sequence: cDNA  
Sequence:

ATGAAACAACT TGCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60  
CAGGAACACGT TTCCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120  
TGTGACAAAT GTCCCTCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180  
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCCAG TGACGAGTGT 240  
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300  
CACAAACCGCG TGTCGGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360  
CATAGGAGCT GCCCCCTCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCCAGA GCGAAATACA 420  
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCCCTGT 480  
AGAAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCGTCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540  
CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600  
CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCCTACAA AGTTACGCC TAACTGGCTT 660  
AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720  
AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780  
AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAACACAGC 840

GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900  
AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCGAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCATGCAA 960  
CCCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCACT TTGTGGCGAA TAAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020  
ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTCAAAGA CGTACCAACTT TCCCAAAACT 1080  
GTCACTCAGA GTCTAAAGAA GACCATCAGG TTCCCTTCACA GCTTCACAAT GTACAAATTG 1140  
TATCAGAAAGT TATTTTTAGA AATGATAGGT AACCAAGTCC AATCAGTAAA AATAAGCTGC 1200  
TTATAA 1206

#### Brief description of the figures

Figure 1 shows an elution profile in the case of a HiLoad-Q/FF nonadsorption fraction crude purification product (Sample 3) applied to a HiLoad-S/HP column.

Figure 2 shows an elution profile in the case of a heparin-5PW fraction crude purification product (Sample 5) applied to a Blue-5PW column.

Figure 3 shows an elution profile in the case of Blue-5PW elution fractions 49-50 applied to a reverse-phase column.

Figure 4 shows the results of SDS-PAGE carried out under reducing or nonreducing conditions for the final purification product.

Explanation of symbols

Lane 1, 4: molecular weight markers

; Lane 2, 5: peak 6

Lane 3, 6: peak 7

Figure 5 shows an elution profile in the case of reduced pyridylethylated and subsequent lysyl endoprotease-treated peak 7 applied to a reverse-phase column.

Document name: Drawings

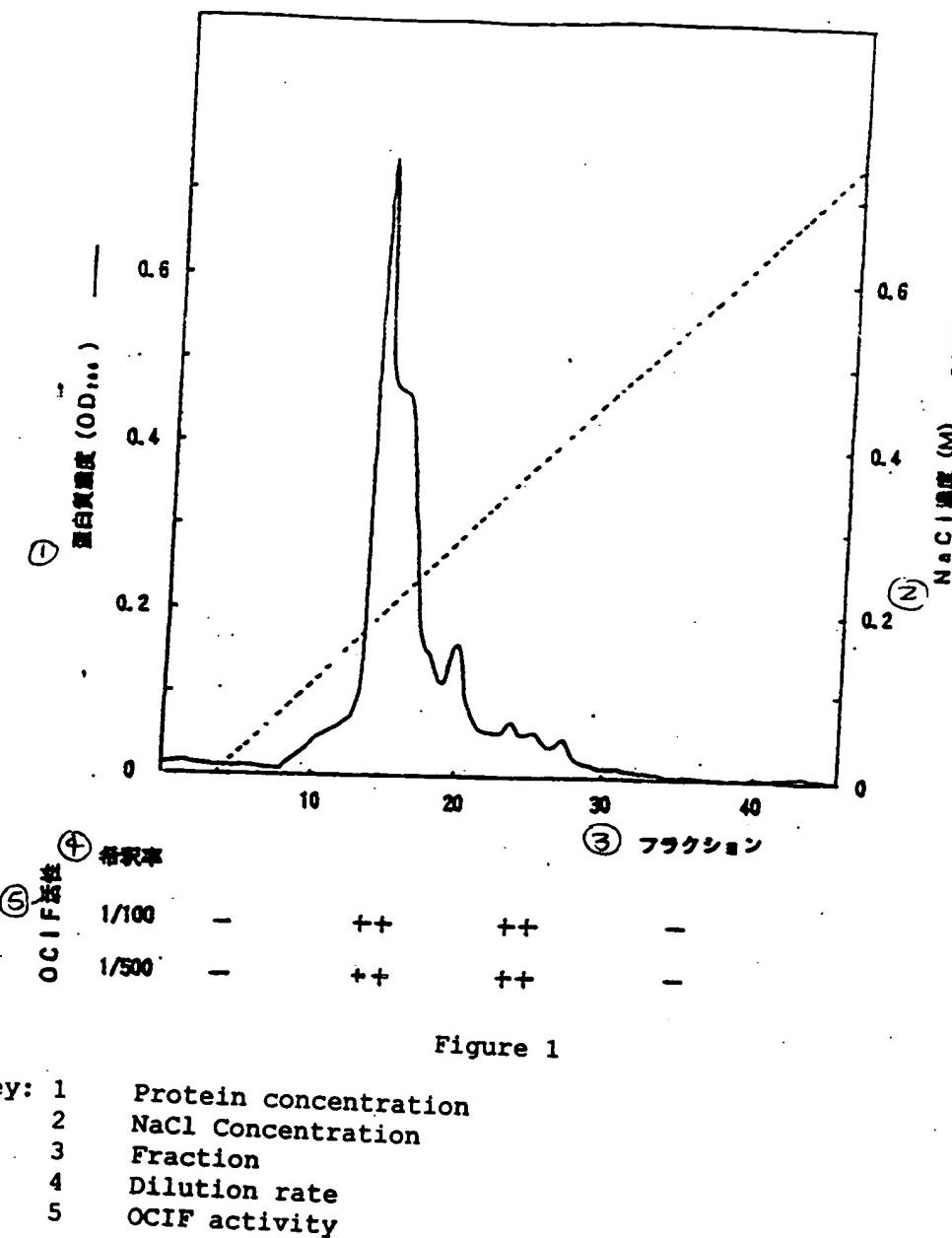


Figure 1

Key:

- 1 Protein concentration
- 2 NaCl Concentration
- 3 Fraction
- 4 Dilution rate
- 5 OCIF activity

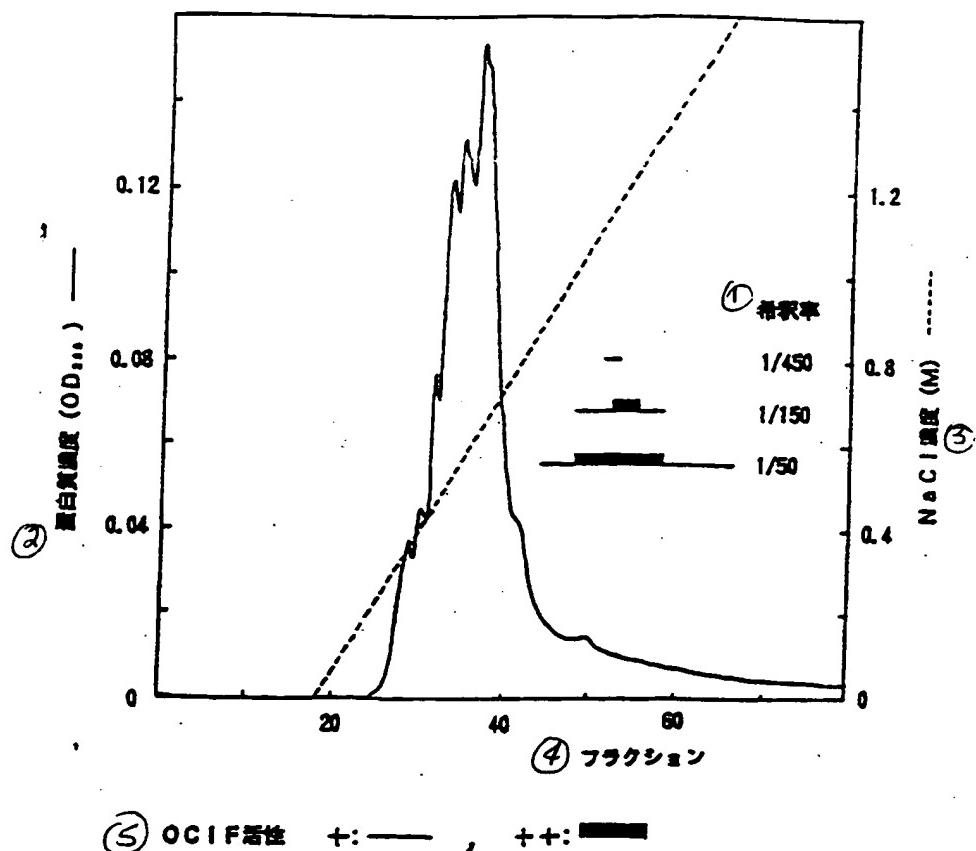


Figure 2

- Key:
- 1 Dilution rate
  - 2 Protein concentration
  - 3 NaCl concentration
  - 4 Fraction
  - 5 OCIF activity

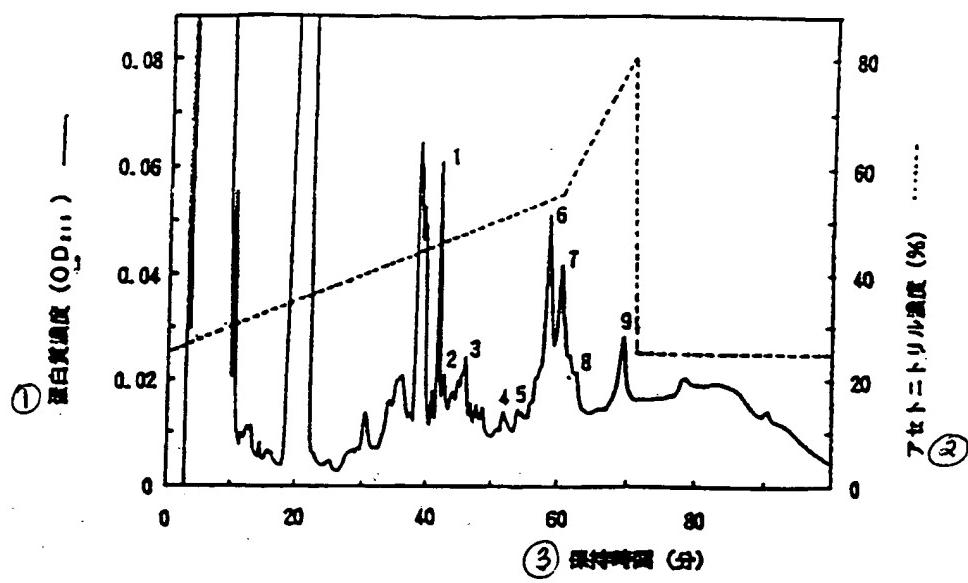


Figure 3

Key: 1 Protein concentration  
 2 Acetonitrile concentration  
 3 Retention time (min)

(1) レーン

1 2 3

(kD)

94

67

43

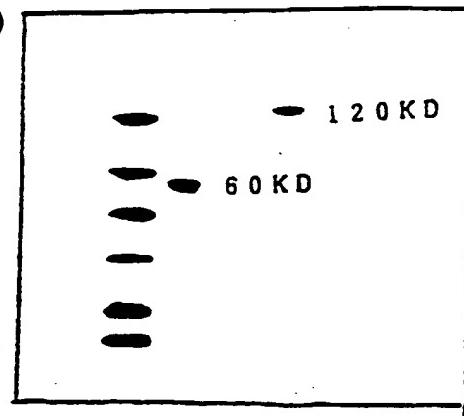
30

20.1

14.4

120 KD

60 KD



(2) 非還元

(1) レーン

4 5 6

(kD)

94

67

43

30

20.1

14.4

(3) 還元

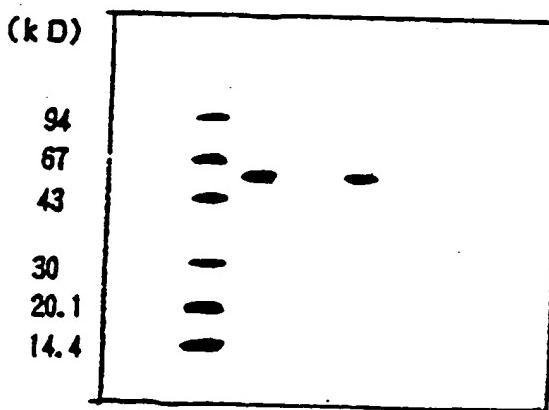


Figure 4

Key: 1 Lane  
 2 Nonreducing  
 3 Reducing

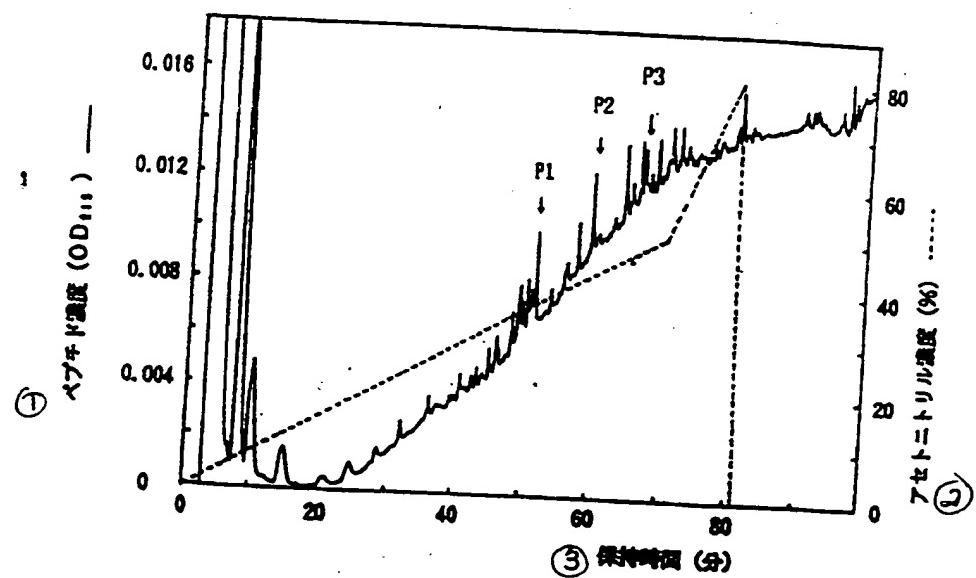


Figure 5

Key: 1 Peptide concentration  
 2 Acetonitrile concentration  
 3 Retention time (min)

Document name: Summary

Abstract

Constitution

Protein having the following physicochemical properties and activity inhibiting differentiation and/or maturation of osteoclasts:

(a) Molecular weight (by SDS-PAGE): about 60 kD (under reducing conditions) or about 60 kD and about 120 kD (under nonreducing conditions);

(b) Affinity: showing affinity to cation exchanger, Cibacron Blue gel and heparin;

(c) Thermal stability: the osteoclast differentiation/maturation inhibition activity is reduced by a thermal treatment at 70°C for 10 min or 56°C for 30 min, and the osteoclast differentiation/maturation inhibition activity is lost by a thermal treatment at 90° for 10 min,

(d) Amino acid sequence: as an internal amino acid sequence, it has the amino acid sequence of sequence Nos. 1-3 in the sequence table.

Process for the production of an osteoclast inhibitory protein, characterized by carrying out cell culture of human fibroblasts and purifying the culture solution by using ion-exchange, affinity and reverse-phase columns to carry out adsorption and elution repeatedly. This protein can also be produced by genetic engineering means.

**Effects**

The protein is useful as a drug for treating various bone loss diseases such as osteoporosis, etc., or a biochemical reagent.

**Selected Drawing:** None

**Document Name:** Correction data  
**Correction Document:** Patent application

**Recognized information/added information****Patent applicant:**

**Identification No.:** 000006699  
**Address:** 6-1-1 Inaho-cho, Higashi-ku,  
**Name:** Sapporo-shi, Hokkaido  
Yukijirushi Nyugyo K.K.

**Agent:**

**Identification No.:** Petitioner  
**Address:** 100090941  
c/o Fujino-Kodama Patent Attorney  
Office, Mitsuhamama Bldg. 8th Floor,  
**Name or title:** 1-2-1 Yotsuya, Shinjuku-ku, Tokyo  
Kiyonari Fujino

**Agent:**

**Identification No.:** Petitioner  
**Address:** 100105061  
c/o Fujino-Kodama Patent Attorney  
Office, Mitsuhamama Bldg. 8th Floor,  
**Name or title:** 1-2-1 Yotsuya, Shinjuku-ku, Tokyo

Name or title: Yoshihiro Kodama

Submitted Article:

Name of submitted article: Receipt 1

[illegible seal]

Form 7

Receipt

Notification No.: 7 Document No.: 978

Notification Date: June 21, 1995

Yukijirushi Nyugyo K.K., Biological Science Research Center  
Mr. Yasuyoshi Takeshita, Director

Industrial Technology Bureau, Life Science  
Technology Research Institute, Director  
Michio Ohishi [Seal]

I. Microorganism identifier

(Identifier given by depositer for identification)

(Deposition No.)

pBK/01F10

FERM P-14998

II. Scientific properties and taxonomic position

The microorganism shown in column I has a document  
describing the following items.

Scientific properties

Taxonomic position

III. Receipt and deposition

The microorganism of column I received on June 21, 1995 has been deposited at this institution.

Applicant history information

Identification No.: 000006699

1. Amendment Date: August 28, 1990

; Amendment reason: New registration

Address: 6-1-1 Inaho-cho, Higashi-ku,  
Sapporo-shi, Hokkaido

Name: Yukijirushi Nyugyo K.K.

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

18.03.96

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1995年 7月21日

REC'D 10 JUN 1996  
WIPO PCT

出願番号  
Application Number:

平成 7年特許願第207508号

出願人  
Applicant(s):

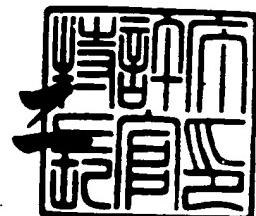
雪印乳業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1996年 5月10日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

清川佑



出証番号 出証特平08-3027246

【審査名】 特許願

【整理番号】 SNMFP95239

【提出日】 平成 7年 7月21日

【あて先】 特許庁長官 清川 佑二 殿

【発明の名称】 新規蛋白質及びその製造方法

【請求項の数】 10

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町下古山456-1

【氏名】 後藤 雅昭

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町石橋622 マロニエハイツ20  
1

【氏名】 津田 英資

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県河内郡南河内町緑5-22-6

【氏名】 望月 伸一

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15 西浦ハイツ3  
-1

【氏名】 矢野 和樹

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県河内郡河内町下岡本3777-4

【氏名】 小林 文枝

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県河内郡南河内町緑4丁目17の5

【氏名】 島 伸行

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県小山市神山1-4-14 レックス小山プレニエ  
107号

500-1-1-1

【氏名】 保田 尚孝

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町石橋 578-15 西浦ハイツ 2

- 4

【氏名】 中川 信明

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県下都賀郡壬生町幸町 3 丁目 11 の 12

【氏名】 森永 伴法

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市今福 1672-1 メゾンむさし野 719

【氏名】 上田 正次

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市山田 1769-10

【氏名】 東尾 侃二

【特許出願人】

【識別番号】 000006699

【氏名又は名称】 雪印乳業株式会社

【代表者】 片山 純男

【代理人】

【識別番号】 100090941

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤野 清也

【電話番号】 3226-6671

【代理人】

【識別番号】 100105061

【弁理士】

【氏名又は名称】 児玉 喜博

【電話番号】 3226-6671

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成 7年特許願第 54977号

【出願日】 平成 7年 2月20日

【手数料の表示】

【納付方法】 予納

【予納台帳番号】 014834

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証 1

【包括委任状番号】 9406430

【類名】 明細

【発明の名称】 新規蛋白質及びその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質。

(a) 分子量 (SDS-PAGEによる) ; 約60kD (還元条件下)、約60kD及び約120kD (非還元条件下)

(b) 親和性; 鹽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。

(c) 熱安定性; 70°C、10分間または56°C、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下し、90°C、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失なわれる。

(d) アミノ酸配列; 内部アミノ酸配列として配列表 配列番号1～3のアミノ酸配列をもつ。

【請求項2】 ヒト線維芽細胞が産生する、請求項1記載の蛋白質。

【請求項3】 ヒト線維芽細胞を細胞培養し、培養液をイオン交換カラム、ヘパリンカラム、アフィニティーカラム及び逆相カラムへの吸着及び溶出を行なって精製することを特徴とする請求項1または2記載の蛋白質の製造方法。

【請求項4】 アルミニナセラミック片を担体として使用して細胞培養を行なう請求項3記載の蛋白質の製造方法。

【請求項5】 配列表 配列番号4で示されるアミノ酸配列をコードするcDNA。

【請求項6】 配列表 配列番号4で示されるアミノ酸配列をコードするcDNAとハイブリダイズするDNA。

【請求項7】 配列表 配列番号5の塩基配列で示されるcDNA。

【請求項8】 配列表 配列番号4で示されるアミノ酸配列をコードするcDNAが発現された蛋白質。

【請求項9】 配列表 配列番号4で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするcDNAが発現され、破骨細分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質。

【請求項 10】 配列表 配列番号4で示されるアミノ酸配列をコードするcDNAを遺伝子として用いて、次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法。

- (a) 分子量 (SDS-PAGEによる) : 約60kD (還元条件下)、約60kD及び約120kD (非還元条件下)
- (b) 親和性: 鹽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。
- (c) 熱安定性; 70°C、10分間または56°C、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下し、90°C、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失なわれる。
- (d) アミノ酸配列; 内部アミノ酸配列として配列表 配列番号1～3のアミノ酸配列をもつ。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【産業上の利用分野】

本発明は、破骨細胞の分化及び／又は成熟を抑制する活性を示す新規な蛋白質、即ち破骨細胞形成抑制因子 (Osteoclast Inhibitory Factor; OCIF) 及びその製造方法に関する。

##### 【0002】

##### 【従来の技術】

人の骨は絶えず吸収と再形成を繰り返しているが、この過程で中心的な働きをしている細胞が、骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞である。これらの細胞が担当している骨代謝の異常により発生する疾患の代表として骨粗鬆症が挙げられる。この疾患は骨芽細胞による骨形成を破骨細胞による骨吸収が上回ることにより発生する疾患である。この疾患の発生メカニズムについては未だ完全には解明されていないが、この疾患は骨の疼痛を発生し、骨の脆弱化による骨折の原因となる疾患である。高齢人口の増加に伴い、骨折による寝たきり老人の発生の原因となるこの疾患は社会問題にもなっており、その治療薬の開発が急務となっている。このような骨代謝異常による骨量減少症は骨吸収の抑制、骨形成の促進、或いはこれらのバランスの改善により治療することが期待される

## 【0003】

骨形成は、骨形成を担当する細胞の増殖、分化、活性化を促進すること、或いは骨吸収を担当する細胞の増殖、分化、活性化を抑制することにより促進することが期待される。近年、このような活性を有する生理活性蛋白質（サイトカイン）への関心が高まり、精力的な研究が行われている。骨芽細胞の増殖或いは分化を促進するサイトカインとして、線維芽細胞増殖因子ファミリー（fibroblast growth factor : FGF : Rodan S.B. et al., Endocrinology vol. 121, p1917, 1987）、インシュリン様増殖因子-I（insulin like growth factor-I : IGF-I : Hock J. M. et al., Endocrinology vol. 122, p254, 1988）、インシュリン様増殖因子-II（IGF-II: McCarthy T. et al., Endocrinology vol.124, p301, 1989）、アクチビンA（Activin A : Centrella M. et al., Mol. Cell. Biol. vol. 11, p250, 1991）、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$ （transforming growth factor- $\beta$  : Noda M., The Bone, vol. 2, p29, 1988）、バスキュロトロピン（Vasculotropin ; Varonique M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 199, p380, 1994）、及び異所骨形成因子ファミリー（bone morph genic protein : BMP : BMP-2 ; Yamaguchi, A et al., J. Cell Biol. vol. 113, p682, 1991, OP-1 ; Sampath T. K. et al., J. Biol. Chem. vol. 267, p20532, 1992、Knutsen R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol.194, p1352, 1993）等のサイトカインが報告されている。

## 【0004】

一方、破骨細胞形成、即ち破骨細胞形成の分化及び／又は成熟を抑制するサイトカインとしては、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$ （transforming growth factor- $\beta$  : Chenu C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.85, p5683, 1988）やインターロイキン-4（interleukin-4 : Kasano K. et al., Bone-Miner., vol. 21, p179, 1993）等が報告されている。又、破骨細胞による骨吸収を抑制するサイトカインとしては、カルシトニン(calcitonin : Bone-Miner., v 1.17, p347, 1992）、マクロファージコロニー刺激因子（macrophage colony-stimulating factor; Hattersley G. et al. J.Cell. Physiol. vol.137, p19

9, 1988)、インターロイキン-4(Watanabe, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 172, p1035, 1990)、及びインターフェロン- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ; Gowen M. et al., J. Bone Miner. Res., vol. 1, p469, 1986) 等が報告されている。

#### 【0005】

これらのサイトカインは、骨形成の促進や骨吸収の抑制による骨量減少症の改善剤となることが期待され、インシュリン様増殖因子-I や異所骨形成因子ファミリーのサイトカイン等、上記のサイトカインの一部については骨代謝改善剤として臨床試験が実施されている。又、カルシトニンは、骨粗鬆症の治療薬、疼痛軽減薬として既に市販されている。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

現在、骨に関わる疾患の治療及び治療期間の短縮を図る医薬品として、臨床では活性型ビタミンD<sub>3</sub>、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン製剤、イブリフラボン又はカルシウム製剤等が使用されている。しかし、これらを用いた治療法はその効果並びに治療結果において必ずしも満足できるものではなく、これらに代わる新しい治療薬の開発が望まれていた。前述したように、骨代謝は骨形成と骨吸収のバランスによって調節されており、破骨細胞の分化・成熟を抑制するサイトカインは、骨粗鬆症等の骨量減少症の治療薬となることが期待される。従って、本発明は新規な破骨細胞形成抑制因子及びその効率的な製造方法を提供することを課題とする。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、このような現状に鑑み銳意探索の結果、ヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90 (ATCC寄託-受託番号CCL186) の培養液に破骨細胞形成抑制活性、即ち破骨細胞の分化・成熟を抑制する活性を有する蛋白質OCIFを見出すに至った。

また、細胞培養の担体としてアルミニナセラミック片を使用すると本発明の破骨細胞形成抑制因子OCIFを培地中に高濃度に蓄積せしめ、効率よく精製できる

ことを見出した。

さらに、本発明者らは、前記培養液をイオン交換カラム、ヘパリンカラム、アフィニティーカラム及び逆相カラムで順次処理して吸着及び溶出をくり返すことによって前記蛋白質OCIFを効率よく精製する方法を確立した。

#### 【0008】

次に、得られた天然型蛋白質のアミノ酸配列の情報に基づき、この蛋白質をコードするcDNAのクローニングに成功した。さらに、このcDNAを用いて遺伝子工学的手法により破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質を生産する方法を確立するに至った。

本発明は、ヒト胎児肺線維芽細胞に由来し、還元条件下SDS-PAGEにおける分子量が約60kD、非還元条件下SDS-PAGEにおける分子量が約60kD及び約120kDであり、陽イオン交換体及びヘパリンカラムに親和性を有し、70℃、10分間又は56℃、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟を抑制する活性が低下し、90℃10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われることを特徴とする蛋白質に関する。本発明の蛋白質OCIFの構造は、既知の破骨細胞形成抑制因子とは明確に相違する。

さらに本発明は、ヒト線維芽細胞を培養し、培養液をヘパリンカラム処理し、吸着画分を溶出し、溶出液を陰イオン交換カラム処理して非吸着画分を得て、この画分を陽イオン交換カラムにかけ吸着・溶出し、さらにヘパリンカラム、アフィニティーカラム、逆相カラムによって精製して前記蛋白質を採取する、蛋白質OCIFの製造方法に関する。本発明におけるカラム処理は、単に培養液等をヘパリンセファロースカラム等に流下させるものばかりではなく、バッチ法で培養液をヘパリンセファロース等と混合し、カラム処理した場合と同等の効果を奏するものも包含する。又、本発明で使用されるアフィニティーカラムは、特に好ましくはシバクロンブルーカラムが挙げられる。このシバクロンブルーカラムの充填剤は、親水性合成高分子を担体とし色素シバクロンブルーF3GAを結合させたものであり、このカラムは通常ブルーカラムと呼ばれる。

さらに、本発明は、アルミナセラミック片を担体として使用して細胞培養を行なって効率よく前記蛋白質を製造する方法に関する。

## 【0009】

本発明蛋白質OCIFは、ヒト線維芽細胞の培養液から効率良く且つ高収率で単離精製することができる。この原料からの本発明蛋白質OCIFの製造は、生体物質からの蛋白性物質の分離に汎用される通常の方法を用いて、目的とする蛋白質OCIFの物理的、化学的性質を利用した各種の精製操作に従い実施することができる。この濃縮手段として限外濾過、凍結乾燥、及び塩析等の通常の生化学的処理手段が挙げられる。又、精製手段としては、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疏水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、調製用電気泳動等を用いた通常の蛋白性物質の精製に利用される各種の手法を組み合わせて用いることができる。特に好ましくは、原料として用いるヒト線維芽細胞としてヒト胎児肺線維細胞IMR-90 (ATCC-CCL186) を用いることが望ましい。そして原料となるヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90の培養は、ヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90をアルミナセラミック片に付着させ、5%ウシ新生児血清を添加したD MEM培地を培養液として用い、ローラーボトル中で一週間から10日程度静置培養することにより得たものを使用するとよい。又、精製処理を実施する際に界面活性剤として0.1%CHAPS (3-[*(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio*]-1-propanesulfonate) を添加して精製を行うのが望ましい。

## 【0010】

本発明の蛋白質OCIFは、先ず培養液をヘパリンカラム(ヘパリンーセファロースCL-6B、ファルマシア社)にかけ、2M NaClを含む10mM Tris-HCl緩衝液、pH 7.5で溶出させ、ヘパリン吸着性のOCIF画分を得、この画分をQ・陰イオン交換カラム(HiLoad-Q/FF、ファルマシア社)にかけ、その非吸着画分を集めることにより、ヘパリン吸着性で塩基性のOCIF画分として得ることができる。得られたOCIF活性画分はS・陽イオン交換カラム(HiLoad-S/HP、ファルマシア社)、ヘパリンカラム(ヘパリン-5PW、トーソー社)、シバクロンブルーカラム(ブルー-5PW、トーソー社)、逆相カラム(BU-300C4、パーキンエルマー社)にかけることにより単離・精製することができ、この物質は前述した性質によって特

定される。

#### 【0011】

さらに、本発明は、このようにして得られた天然型蛋白質のアミノ酸配列に基づいてこの蛋白質をコードするcDNAをクローニングし、このcDNAを用いて遺伝子工学的手法で破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質OCIFを得る方法に関する。即ち、本発明の方法に従って精製したOCIF蛋白質をエンドプロテアーゼ（例えばリシルエンドペプチダーゼ）で処理後、生ずるペプチドのアミノ酸配列を決定し、得られた内部アミノ酸配列をコードしうるオリゴヌクレオチドの混合物を作製する。

次に、作製したオリゴヌクレオチド混合物をプライマーとし、PCR法（好ましくはRT-PCR法）を利用してOCIF cDNA断片を取得する。このOCIF cDNA断片をプローブとして、cDNAライブラリーよりOCIFの全長cDNAをクローニングする。得られたOCIF cDNAを発現ベクターに挿入してOCIF発現プラスミドを作製し、これを各種の細胞又は菌株に導入して発現させることにより、組換え型OCIFを製造することができる。

#### 【0012】

OCIF活性は、久米川正好らの方法（蛋白質・核酸・酵素、Vol.34, p999 (1989)）及びTakahashi N. et al. の方法（Endocrinology, Vol.122, p1373 (1988)）に従い測定した。即ち、生後約17日のマウス骨髓細胞を標的細胞として用い、活性型ビタミンD<sub>3</sub>(Calcitriol)存在下での破骨細胞の形成抑制を、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導の抑制で試験することにより測定した。

#### 【0013】

本発明の蛋白質である破骨細胞形成抑制因子は、骨粗鬆症等の骨量減少症或いはその他の骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、或いはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。本発明の蛋白質は、製剤化して経口或いは非経口的に投与することができる。即ち、本発明の蛋白質を含む製剤は、破骨細胞形成抑制因子を有効活性成分として含む医薬組成物としてヒト及び動物に対して安全に投与されるものである。

医薬組成物の形態としては、注射用組成物、点滴用組成物、坐剤、経鼻剤、舌

下剤、経皮吸収剤等が挙げられる。注射用組成物の場合は、本発明の破骨細胞形成抑制因子の薬理的有効量及び製薬学的に許容しうる担体の混合物であり、その中にはアミノ酸、糖類、セルロース誘導体、及びその他の有機／無機化合物等の一般的に注射用組成物に添加される賦形剤／賦活剤を用いることもできる。又、本発明の破骨細胞形成抑制因子とこれらの賦形剤／賦活剤を用い注射剤を調製する場合は、必要に応じてpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤等を添加して常法によって各種注射剤とすることができます。

## 【0014】

## 【実施例1】

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。しかしこれらは単に例示するのみであり、本発明はこれらにより限定されるものではない。

ヒト線維芽細胞IMR-90培養液の調製

ヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90(ATCC-CCL186)は、ローラーボトル(490cm<sup>2</sup>、110×171mm、コニング社)中で80gのアルミナセラミック片(アルミナ99.5%、東芝セラミック社)に付着させ培養した。培養には60個のローラーボトルを使用し、ローラーボトル1個当たり5%子牛血清を添加した500mlの10mM HEPES緩衝液添加DMEM培地(ギブコBRL社)を用い、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で7~10日間静置培養した。培養後培養液を回収し、新たな培地を添加することにより1回の培養で30lのIMR-90培養液を得た。得られた培養液を試料1とした。

## 【0015】

破骨細胞形成抑制活性の測定法

本発明の蛋白性破骨細胞形成抑制因子の活性測定は久米川正好らの方法(蛋白質・核酸・酵素 Vol.34 p999(1989))及びTakahashi N. et.alの方法(Endocrinology vol.122 p1373 (1988))に従い測定した。即ち、生後約17日のマウスより分離した骨髄細胞を用い、活性型ビタミンD<sub>3</sub>存在下での破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導を指標として試験し、その抑制活性を測定することによって行った。即ち、96ウェルマイクロプレートに2×10<sup>-8</sup>M活性型ビタミンD<sub>3</sub>及び10%牛胎児血清を含むα-MEM培地(ギブコBRL社)

で希釈したサンプル $100\mu l$ を入れ、生後約17日のマウスから得た骨髄細胞 $3 \times 10^5$ 個を $100\mu l$ の10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地に懸濁させて播種し、5%CO<sub>2</sub>、37℃、湿度100%にて一週間培養した。培養3日目と5日に、培養液 $160\mu l$ を廃棄し、 $1 \times 10^{-8}M$ 活性型ビタミンD<sub>3</sub>及び10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地で希釈したサンプル $160\mu l$ を添加した。培養7日後にリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後エタノール／アセトン(1:1)溶液で細胞を室温にて1分間固定し、破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性測定キット(Acid Phosphatase, Leucocyte、カタログNo 387-A、シグマ社)を用いた染色で検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少をOCIF活性とした。

## 【0016】

OCIFの精製

## i) ヘパリン・セファロースCL-6Bによる精製

約90lのIMR-90培養液(試料1)を、0.22μmのフィルター(親水性ミリディスク、2,000cm<sup>2</sup>、ミリポア社)で濾過した後、3回に分けて0.3M NaClを含む10mM Tris-HCl緩衝液(以下、Tris-HClという)、pH7.5で平衡化させた80mlのヘパリン・セファロースCL-6B(5×4.1cm)にかけた。流速500ml/hrにて、10mM Tris-HCl、pH7.5で洗浄した後、2M NaClを含む10mM Tris-HCl、pH7.5で溶出を行い、ヘパリン・セファロースCL-6B吸着画分900mlを得、得られた画分を試料2とした。

## 【0017】

## ii) HiLoad-Q/FFによる精製

ヘパリン・セファロース吸着画分(試料2)を10mM Tris-HCl、pH7.5に対して透析した後、0.1%になるようにCHAPSを加え4℃で一晩放置したものを、2回に分けて0.1% CHAPSを含む50mM Tris-HCl、pH7.5で平衡化した陰イオン交換カラム(HiLoad-Q/FF、2.6×10cm、ファルマシア社)にかけ、非吸着画分1000mlを得た。得られた画分を試料3とした。

## 【0018】

## iii) HiLoad-S/HPによる精製

HiLoad-Q非吸着画分（試料3）を、0.1%CHAPSを含む50 mM Tris-HCl、pH 7.5で平衡化した陽イオン交換カラム（HiLoad-S/HP、2.6×10 cm、ファルマシア社）にかけた。0.1%CHAPSを含む50 mM Tris-HCl、pH 7.5で洗浄した後、100分間でNaClを1Mにする直線勾配、流速8 ml/分にて溶出を行い、12 ml/フラクションにて分取を行った。フラクション1～40を10フラクションづつ4つの画分にまとめ、それぞれ100 μlを用いてOCIF活性を測定した。OCIF活性はフラクション11～30に認められた（図1 図中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30～80%以上抑制される活性を、-は活性が検出されないことをそれぞれ示す）。より比活性の高いフラクション21～30を試料4とした。

## 【0019】

## iv) アフィニティーカラム（ヘパリン-5 PW）による精製

120 mlの試料4を240 mlの0.1%CHAPSを含む50 mM Tris-HCl、pH 7.5で希釈した後、0.1%CHAPSを含む50 mM Tris-HCl、pH 7.5で平衡化したアフィニティーカラム（ヘパリン-5 PW、0.8×7.5 cm、トーソー社）にかけた。0.1%CHAPSを含む50 mM Tris-HCl、pH 7.5で洗浄した後、60分間でNaClを2Mにする直線勾配、流速0.5 ml/分にて溶出を行い、0.5 ml/フラクションにて分取を行った。各フラクション50 μlを用いてOCIF活性を測定し、約0.7～1.3 M NaClで溶出されるOCIF活性画分10 mlを得、試料5とした。

## 【0020】

## v) アフィニティーカラム（ブルー-5 PW）による精製

10 mlの試料5を190 mlの0.1%CHAPSを含む50 mM Tris-HCl、pH 7.5で希釈した後、0.1%CHAPSを含む50 mM Tris-HCl、pH 7.5で平衡化したアフィニティーカラム（ブルー-5 PW、

0. 5×5. 0 cm、トーソー社)にかけた。0. 1% CHAPSを含む5.0 mM Tris-HCl、pH 7. 5で洗浄した後、60分間でNaClを2Mにする直線勾配、流速0. 5 ml/分にて溶出を行い、0. 5 ml/フラクションにて分取を行った。各フラクション25 μlを用いてOCIF活性を測定し、約1. 0~1. 6M NaClで溶出されるOCIF活性フラクション49~70を得た(図2 図中、+は、OCIF活性を有することを、++は特にOCIF活性が高いことを示す)。

## 【0021】

## vi) 逆相カラムによる精製

得られたフラクション49~50 1mlに、10 μlの25%TFA(トリフルオロ酢酸)を加えた後、0. 1%TFAを含む25%アセトニトリルで平衡化した逆相カラム(BU-300、C4、2. 1×220 mm、パーキンエルマー社)にかけ、60分間でアセトニトリルを55%にする直線勾配、流速0. 2 ml/分にて溶出を行い、各ピークを分取した(図3)。各ピークフラクションの100 μlを用いてOCIF活性を測定し、ピーク6及びピーク7に濃度依存的に活性を検出した。結果を表1に示す。

## 【0022】

【表1】

## 逆相カラムから溶出されたOCIF活性

希釈率	1/40	1/120	1/360	1/1080			
ピーク6	++	++	+	-	-	-	-
ピーク7	++	+	-	-	-	-	-

[表中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30~80%抑制される活性を、-は活性が検出されないことを示す。]

## 【0023】

OCIFの分子量測定

O C I F 活性の認められたピーク 6 及びピーク 7 各  $40 \mu\text{l}$  を用い、還元条件下と非還元条件下で SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。即ち、各ピークフラクション  $20 \mu\text{l}$  づつを 2 本のチューブに分取し減圧濃縮した後、 $1 \text{mM}$  EDTA、 $2.5\%$  SDS、及び  $0.01\%$  プロモフェノールブルーを含む  $10 \text{mM}$  Tris-HCl、pH 8.1.  $5 \mu\text{l}$  で溶解し、それぞれを非還元条件下及び還元条件下 ( $5\%$  2-メルカプトエタノール存在下) で  $37^\circ\text{C}$  で一晩放置後、それぞれの  $1 \mu\text{l}$  を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に負荷した。電気泳動は  $10 - 15\%$  アクリルアミドのグラジエントゲル (ファルマシア社) を使用し、電気泳動装置 Phast System (ファルマシア社) を用いて行った。分子量マーカーとして、ホスホリラーゼ b ( $94 \text{kD}$ )、ウシ血清アルブミン ( $67 \text{kD}$ )、オボアルブミン ( $43 \text{kD}$ )、カルボニックアンヒドライゼ ( $30 \text{kD}$ )、トリプシンインヒビター ( $20.1 \text{kD}$ )、 $\alpha$ -ラクトアルブミン ( $14.4 \text{kD}$ ) を用いた。電気泳動終了後、Phast Gel Silver Stain Kit (ファルマシア社) を用いて銀染色を行った。結果を図 4 に示す。

#### 【0024】

その結果、ピーク 6 については還元条件下、非還元条件下で約  $60 \text{kD}$  の蛋白質のバンドが検出された。又、ピーク 7 については、還元条件下で約  $60 \text{kD}$ 、非還元条件下で約  $120 \text{kD}$  の蛋白質のバンドが検出された。従って、ピーク 7 はピーク 6 の蛋白質のホモダイマーであると考えられる。

#### 【0025】

##### O C I F の熱安定性試験

ブルー 5 PW フラクション 5.1 ~ 5.2 を混合したサンプルから  $20 \mu\text{l}$  づつを取り、 $10 \text{mM}$  リン酸塩緩衝生理食塩水、pH 7.2.  $30 \mu\text{l}$  を加えた後、 $70^\circ\text{C}$  及び  $90^\circ\text{C}$  にて 10 分間、又は  $56^\circ\text{C}$  にて 30 分間熱処理を行った。このサンプルを用い、前述した方法に従い O C I F 活性を測定した。結果を表 2 に示す。

#### 【0026】

【表2】

## O C I F の 热 安定 性

希釈率	1/300	1/900	1/2700		
未処理	++	+	-		
70℃10分	+	-	-		
56℃30分	+	-	-		
90℃10分	-	-	-		

〔表中、++、+、-の意味については表1参照〕

【0027】

## (5) 内部アミノ酸配列の決定

ブルーー5 PW フラクション 51~70について、2 フラクションづつを混合して 1ml とし、それぞれの試料に  $10\ \mu l$  の 25% TFA を加えた後、1ml ずつ 10 回にわけて 0.1% TFA を含む 25% アセトニトリルで平衡化した逆相カラム (BU-300、C4、2.1 × 220 mm、パーキンエルマー社) にかけ、60 分間でアセトニトリルを 55% にする直線勾配、流速 0.2 ml / 分にて溶出を行い、ピーク 6 とピーク 7 を集めた。得られたピーク 6 とピーク 7 の一部について、それぞれプロテインシーケンサー (プロサイズ、494型、パーキンエルマー社) を用い、N 末端アミノ酸配列分析を行ったが、分析不能でありこれらの蛋白質につき N 末端はブロックされている可能性が示唆された。そこで、これらの蛋白質の内部アミノ酸配列を解析した。即ち、ピーク 6 とピーク 7 のそれを遠心濃縮した後、それぞれに  $100\ \mu g$  ジチオスレイトール、10 mM EDTA、7 M 塩酸グアニジン、及び 1% CHAPS を含む 0.5 M Tris-HCl、pH 8.5 50  $\mu l$  を加えて室温で 4 時間放置し還元した後、0.2  $\mu l$  の 4-ビニルビリジンを加え、室温暗所で一晩放置しビリジルエチル化した。これらのサンプルに  $1\ \mu l$  の 25% TFA を加え、0.1% TFA を含む 20% アセトニトリルで平衡化した逆相カラム (BU-300、C4、2.1 × 3

0 mm、パーキンエルマー社)にかけ、30分間でアセトニトリル濃度を50%にする直線勾配、流速0.3 ml/分で溶出を行い、還元ビリジルエチル化サンプルを得た。還元ビリジルエチル化したサンプルのそれぞれを遠心濃縮し、8M 尿素及び0.1% Tween 80を含む0.1M Tris-HCl、pH 9 25 μlで溶解した後、73 μlの0.1M Tris-HCl、pH 9で希釈し、0.02 μgのAP1(リシリエンドプロテアーゼ、和光純薬社)を加え、37°Cで15時間反応させた。反応液に1 μlの25%TFAを加え、0.1%TFAで平衡化した逆相カラム(RP-300、C8、2.1×220 mm、パーキンエルマー社)にかけ、70分間でアセトニトリル濃度を50%にする直線勾配、流速0.2 ml/分で溶出を行い、ペプチドフラグメントを得た(図5)。得られたペプチドフラグメント(P1~P3)について、プロテインシーケンサーを用いアミノ酸配列分析を行った。結果を配列表 配列番号1~3に示す。

## 【0028】

(6) cDNA配列の決定i) IMR-90細胞からのポリ(A)<sup>+</sup>RNAの単離

IMR-90細胞のポリ(A)<sup>+</sup>RNAは、ファストトラックmRNAアイソレーションキット(インヴィトロージェン社)を用い、そのマニュアルに準じて単離した。この方法により $1 \times 10^8$  個のIMR-90細胞より約10 μg のポリ(A)<sup>+</sup>RNA を取得した。

## 【0029】

ii) ミックスプライマーの作製

先に得られたペプチド(配列表 配列番号2及び3)のアミノ酸配列をもとに、次の2種のミックスプライマーを合成した。即ち、ペプチドP2の6番目(Gln)から12番目(Leu)までのアミノ酸配列をコードしうるすべての塩基配列を持つオリゴヌクレオチドの混合物(ミックスプライマー、No.2F)を合成した。また、ペプチドのP3の6番目(His)から12番目(Lys)までのアミノ酸配列をコードしうるすべての塩基配列に対する相補的オリゴヌクレオチドの混合物(ミックスプライマー、No.3R)を合成した。ミックスプライマー N.2FおよびNo.3R の塩基配列を以下に示す。

【0030】

No.2F:

5'-CAAGAACAAACTTTCAATT-3'

G G G C C C GC

A

G

【0031】

No.3R:

5'-TTTATACATTGTAAAAGAATG-3'

C G C G GCTG

A C

G T

【0032】

iii OCIFcDNA断片のPCRによる増幅

(6)-i で得たポリ(A) + RNA、1 μg を録型としてスーパースクリプトII c DNA合成キット(ギブコB R L社)を用いて、同社のプロトコールに従って一本鎖cDNAを合成し、このcDNAと(6)-iiで示したプライマーを用いて、PCRを行い、OCIFcDNA断片を取得した。以下に条件を示す。

10X Ex Taqバッファー(宝酒造社)	5 μl
2.5 mM dNTP	4 μl
cDNA溶液	1 μl
Ex Taq(宝酒造社)	0.25 μl
蒸留水	29.75 μl
40 μM プライマーNo.2F	5 μl
40 μM プライマーNo.3R	5 μl

上記の溶液を微量遠心チューブ中で混合後、以下の条件でPCRを行った。95℃で3分前処理後、95℃30秒、50℃30秒、70℃2分の3段階の反応を30回繰り返したのち、70℃5分保温した。反応液の一部をアガロース電気泳動し約400bpの均一なDNA断片が得られたことを確認した。

【0033】

- (7) PCRにより増幅されたOCIFcDNA断片のクローニング及び塩基配列決定

(6)-iii で得られたDNA断片をライゲーションキット（宝酒造社）を用いてブルースクリプトベクター(pBluescript II sk<sup>-</sup>；ストラタジーン社)に挿入し、大腸菌DH5<sup>α</sup>（ギブコBRL社）の形質転換を行った。得られた形質転換株を増殖させ、約400bp のO C I F c DNA断片が挿入されたプラスミドを常法に従い精製した。得られたプラスミドに挿入されているO C I F c DNAの塩基配列をタックダイデオキシターミネーターサイクルシークエンシングキット(Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit; パーキンエルマー社)を用いて決定した。この塩基配列から予測される132 個のアミノ酸からなるアミノ酸配列中に、ミックスプライマーを設計するのに用いたO C I F の内部アミノ酸配列（配列表番号2及び3）をそれぞれN末側、C末側に見出すことができた。また、O C I F の内部アミノ酸配列（配列番号1）を、この132 個のアミノ酸からなるアミノ酸配列中に見出すことができた。以上の結果より、クローニングした約400bp のc DNAは、O C I F c DNA断片であることが確認された。

## 【0034】

(8) DNAプローブの作製

(7) で作成された約400bp のO C I F c DNA断片が挿入されたプラスミドを鑄型にして(6)-iii の条件でPCR を行なうことにより、このO C I F c DNA断片を増幅した。アガロース電気泳動により約400bp のO C I F c DNA断片を得た。このDNA をメガプライムDNA ラベリングキット（アマジャム社）を用いて [ $\alpha$  <sup>32</sup>P] dCTP で標識し、全長のO C I F c DNAをスクリーニングするためのプローブとして用いた。

## 【0035】

(9) cDNAライブラリーの作成

(6)-i で得られたポリ(A)<sup>+</sup> RNA、2.5  $\mu$ g を鑄型としてグレートレンジス c DNA合成キット（クロンテック社）を用いて同社のプロトコールに従い、olig o(dT) primer を用いてc DNAの合成、EcoRI-SalI-Not-Iアダプター付加、c DNAサイズフラクショネーションを行いエタノール沈殿の後10  $\mu$ l のTEバッファーに溶解した。得られたアダプター付加c DNA、0.1  $\mu$ g をT4DNA リガーゼを用いてあらかじめEc RI で切断した1  $\mu$ g のλZAP エクスプレスベクター（スト

ラタジーン社)に挿入した。このようにして得られたcDNA組み換えファージDNA溶液をギガパックゴールドII(ストラタジーン社)を用いてインヴィトロパッケージング反応に供し、λZAP エクスプレス組み換えファージを作成した。

## 【0036】

(10) 組み換えファージのスクリーニング

(9) 得られた組み換えファージを37°Cで15分間大腸菌 XL1-Blue MRF'(ストラタジーン社)に感染させたのち、50°Cに加温した0.7%の寒天を含むNZY 培地に添加し、NZY 寒天培地プレートに流しこんだ。37°Cで一晩培養後、ブラークの生じたプレート上にハイボンドN(アマシャム社)を約30秒密着させた。このフィルターを常法に従いアルカリ変性の後、中和し、2XSSC 溶液に浸したのちUVクロスリンク(ストラタジーン社)によりDNAをフィルターに固定化した。得られたフィルターを100 μg/mlのサケ精子DNAを含むハイブリダイゼーションバッファー(アマシャム社)に浸漬し65°Cで4時間前処理した後、熱変性した上記DNAプローブ( $2 \times 10^5$ cpm/ml)を添加した上記バッファーに移し替え65°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。反応後フィルターを2XSSCで2回、0.1XSSC、0.1%SDS溶液で2回それぞれ65°Cで10分間洗浄した。得られたいくつかの陽性クローンを、さらに2回スクリーニングを行うことにより純化した。それらの中から約1.6kbのインサートを持つものを以下に用いた。純化したファージをλZAP エクスプレスクローニングキット(ストラタジーン社)のプロトコールに従い、大腸菌XL1-Blue MRF'に感染させたのち、ヘルバーファージExAssist(ストラタジーン社)で多重感染を行い、その培養上清を大腸菌XL0LR(ストラタジーン社)に感染させたのちカナマイシン耐性株を捨うことによりpBKCMV(ストラタジーン社)に上述の1.6kbのインサートが挿入されたプラスミドをもつ形質転換株を得た。この形質転換株は、FERM P-14998として通商産業省工業技術院生命工学技術研究所に寄託してある。このプラスミドをもつ形質転換株を増殖させ、常法によりプラスミドを精製した。

## 【0037】

(11) OCIFの全アミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列の決定

(10) 得られたOCIF cDNAの塩基配列をタックダイデオキシタミネー

ターサイクルシークエンシングキット（パーキンエルマー社）を用いて決定した。用いたプライマーはT3, T7 プライマー（ストラタジーン社）及びOCIF cDNAの塩基配列に基づいて設計された合成プライマーで、その配列は以下に示す。

T3; 5'-AATTAACCTCACTAAAGGG-3'  
 ;  
 T7; 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'  
 IF1; 5'-ACATCAAAACAAAGACCAAG-3'  
 IF2; 5'-TCTTGGTCCTTGTTTGATG-3'  
 IF3; 5'-TTATTGCCACAAACTGAGC-3'  
 IF4; 5'-TTGTGAAGCTGTGAAGGAAC-3'  
 IF5; 5'-GCTCAGTTGTGGCGAATAA-3'  
 IF6; 5'-GTGGGAGCAGAACACATTGA-3'  
 IF7; 5'-AATGAACAACTTGCTGTGCT-3'  
 IF8; 5'-TGACAAATGTCCTCCTGGTA-3'  
 IF9; 5'-AGGTAGGTACCAGGAGGACA-3'  
 IF10; 5'-GAGCTGCCCTCCTGGATTTG-3'  
 IF11; 5'-CAAACGTATTCGCTCTGG-3'  
 IF12; 5'-GTGTGAGGAGGCATTCTTCA-3'

決定されたOCIFの塩基配列を配列番号5に、その配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号4に示す。

### 【0038】

#### (12) OCIF cDNA の発現プラスミドの作製

(10)で得られた約1.6kb のOCIF cDNAが挿入されたプラスミドを制限酵素BamHI およびXbaIで消化し、OCIF cDNAを切り出し、アガロース電気泳動によって分離後、QIAEX DNA アイソレーションキットを用いて精製した。このOCIF cDNAを、あらかじめ制限酵素BamHI およびXbaIで消化しておいた発現プラスミドpCEP4(インヴィトロージェン社)に、ライゲーションキット(宝酒造社)を用いて挿入し、大腸菌DH5  $\alpha$  (ギブコBRL社)の形質転換を行った。得られた形質転換株を増殖させ、OCIF cDNAが挿入された発現プラスミド

をキアゲンカラム（キアゲン社）を用いて精製した。OCIF発現プラスミドをエタノールによって沈殿させた後、無菌蒸留水に溶解し以下の操作に用いた。

## 【0039】

(13) OCIF cDNAのトランジェントな発現およびその活性の測定

(12)で得られたOCIF発現プラスミドを用いて、以下に述べる方法で組み換えOCIFを発現させ、その活性を測定した。 $8 \times 10^5$  個の293/EBNA細胞（インヴィトロージェン社）を6ウェルプレートの各ウェルに 10%牛胎児血清（ギブコBRL社）を含むIMDM培地（ギブコBRL社）を用いて植え込み、翌日、培地を除いた後、無血清IMDM培地で細胞を洗った。トランスフェクション用試薬リポフェクタミン（ギブコBRL社）添付のプロトコールに従い、あらかじめOPTI-MEM培地（ギブコBRL社）を用いて希釈しておいたOCIF発現プラスミドとリポフェクタミンを混合した後、この混合液を各ウェルの細胞に加えた。用いた発現プラスミドおよびリポフェクタミンの量はそれぞれ $3 \mu\text{g}$  および $12 \mu\text{l}$  であった。38時間後、培地を除き $1 \text{ml}$  の新しいOPTI-MEM培地を加え、さらに30時間後、培地を回収し、これをOCIF活性測定用サンプルとした。OCIFの活性測定は以下のようにして行った。生後約17日のマウス骨髄細胞からの活性型ビタミンD<sub>3</sub>存在下での破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導で試験し、その抑制活性を測定し、OCIFの活性とした。すなわち、96ウェルマイクロプレートに $2 \times 10^{-8}\text{M}$ 活性型ビタミンD<sub>3</sub>及び10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地（ギブコBRL社）で希釈したサンプル $100 \mu\text{l}$ を入れ、生後約17日のマウス骨髄細胞 $3 \times 10^5$  個を $100 \mu\text{l}$ の10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地に懸濁させて播種し、5%CO<sub>2</sub>、37°C、湿度100%にて一週間培養した。培養3日目と5日目に、培養液 $160 \mu\text{l}$ を廃棄し、 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 活性型ビタミンD<sub>3</sub>及び10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地で希釈したサンプル $160 \mu\text{l}$ を添加した。培養7日後にリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後エタノール／アセトン（1：1）溶液で細胞を室温にて1分間固定し、破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性測定キット（Acid Phosphatase, Leucocyte、カタログNo 387-A、シグマ社）を用いた染色で検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少をOCIF活性とした。その結

果、表3に示すように、先にIMR-90の培養液から得られた天然型OCIFと同様の活性を有することが確認された。

## 【0040】

【表3】

## 293/EBNA細胞で発現させた培養液中のOCIF活性

希釈率	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
OCIF	-	-	-	-	-	-	-
遺伝子導入	++	++	++	++	++	+	-
ベクター導入	-	-	-	-	-	-	-
未処理	-	-	-	-	-	-	-

〔表中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30~80%抑制される活性を、-は活性が検出されないことを示す。〕

## 【0041】

## 【発明の効果】

本発明により、新規な破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質及びその効率的な製造方法が提供される。本発明の蛋白質は破骨細胞形成抑制活性を有し、骨粗鬆症等各種の骨量減少性疾患の治療剤として或いはこれらの疾患の免疫学的診断のための抗原等として有用である。

【0042】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド (蛋白質の内部アミノ酸)

配列：

Xaa Tyr His Phe Pro Lys

1 5

【0043】

配列番号：2

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド (蛋白質の内部アミノ酸)

配列：

Xaa Gln His Ser Xaa Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Xaa Lys

1 5 10

【0044】

配列番号：3

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド (蛋白質の内部アミノ酸)

配列：

Xaa Ile Arg Phe Leu His Ser Ph Thr Met Tyr Lys

1 5 10

[0045]

配列番号：4

配列の長さ：401

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列：

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser

1 5 10 15

Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His

20 25 30

Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro

35 40 45

Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr

50 55 60

Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His

65 70 75

Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu

80 85 90

Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys

95 100 105

Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys

110 115 120

His Arg Ser Cys Pr Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr

125 130 135

Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pr Asp Gly Phe Phe

140	145	150
Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn		
155	160	165
Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr		
170	175	180
'His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys		
185	190	195
Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala		
200	205	210
Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp		
215	220	225
Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile		
230	235	240
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		
245	250	255
Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile		
260	265	270
Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile		
275	280	285
Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu		
290	295	300
Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr		
305	310	315
Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Ser		
320	325	330
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu		
335	340	345
Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr		
350	355	360

Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe			
	365	370	375
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly			
	380	385	390
Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu			
	395	400	

[0046]

配列番号：5

配列の長さ : 1206

## 配列の型：核酸

鎖の数：1

#### トポロジー：直鎖状

## 配列の種類：cDNA

## 配列：

ATGAAACAAC TGCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60  
CAGGAAACGT TTCCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120  
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180  
GTGTGCCCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240  
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCAC 300  
CACAAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360  
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCCAGA GCGAAATACA 420  
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCCCTGT 480  
AGAAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTGGT CTCCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540  
CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600  
CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660  
AGTGTCTTGG TAGACAATT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720  
AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780  
AACAAAGACC AAAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840

GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900  
AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCAATGCAAA 960  
CCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCACT TTGTGGCGAA TAAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020  
ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTCAAAGA CGTACCAACTT TCCCAAAACT 1080  
GTCACTCAGA GTCTAAAGAA GACCATCAGG TTCCTTCACA GCTTCACAAT GTACAAATTG 1140  
TATCAGAAGT TATTTT TAGA AATGATAGGT AACCAAGGTCC AATCAGTAAA AATAAGCTGC 1200  
TTATAA 1206

【図面の簡単な説明】

【図1】

Hi Load-Q/FF非吸着画分粗精製製品（試料3）をHi Load-S/HPカラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

【図2】

ヘパリン-5 PW粗精製製品（試料5）をブルー-5 PWカラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

【図3】

ブルー-5 PW溶出フラクション49~50を逆相カラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

【図4】

最終精製製品の還元条件下と非還元条件下におけるSDS-PAGEの結果を示す。

【符号の説明】

レーン1、4；分子量マーカー

レーン2、5；ピーク6

レーン3、6；ピーク7

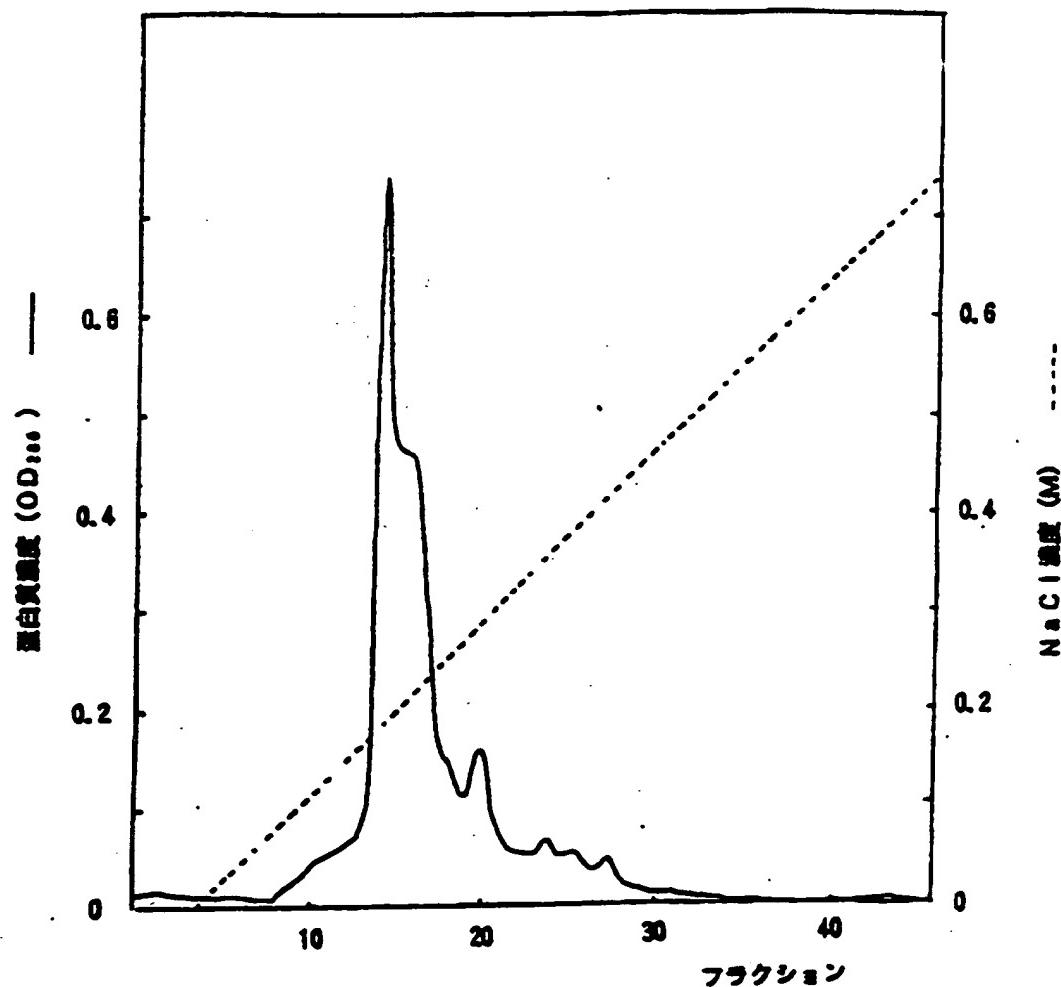
【図5】

還元ビリジルエチル化後、リシリエンドプロテアーゼ処理したピーク7を逆相カラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

【類名】

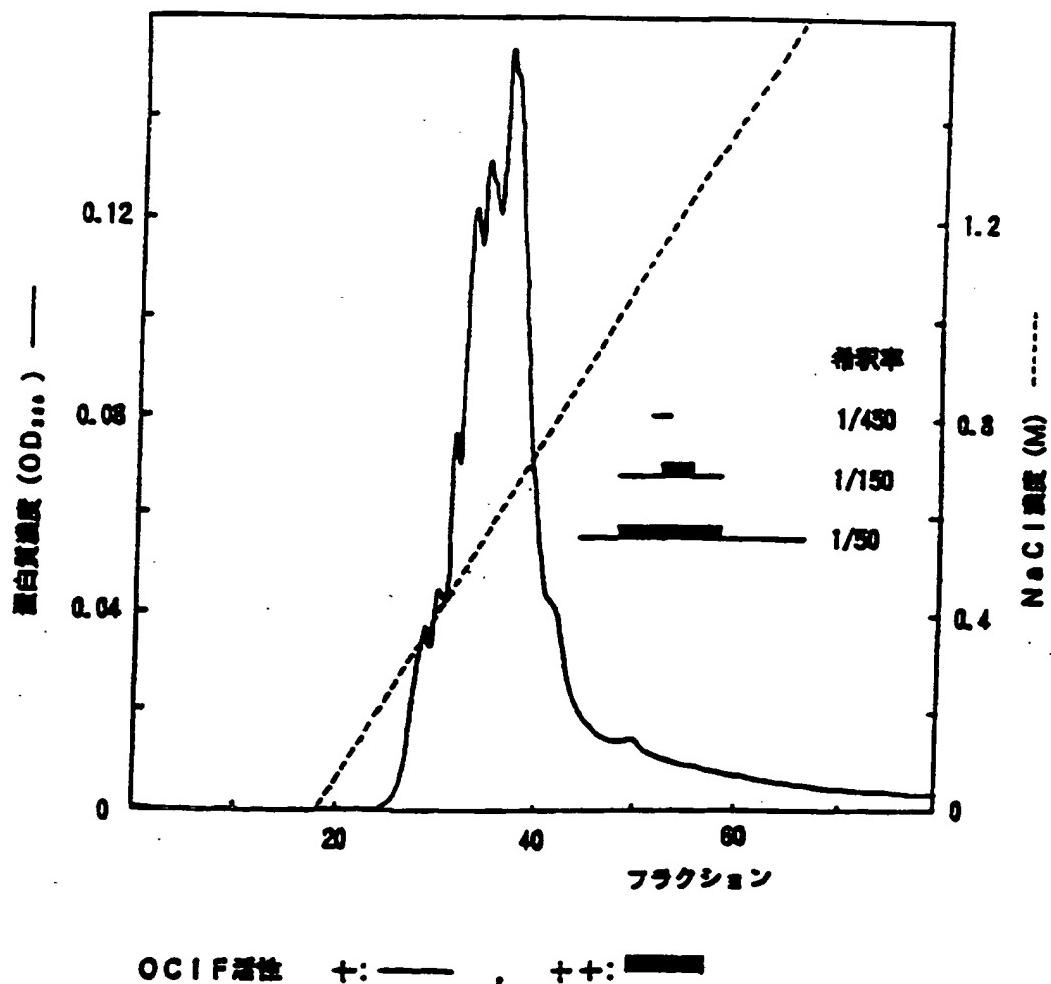
図面

【図1】

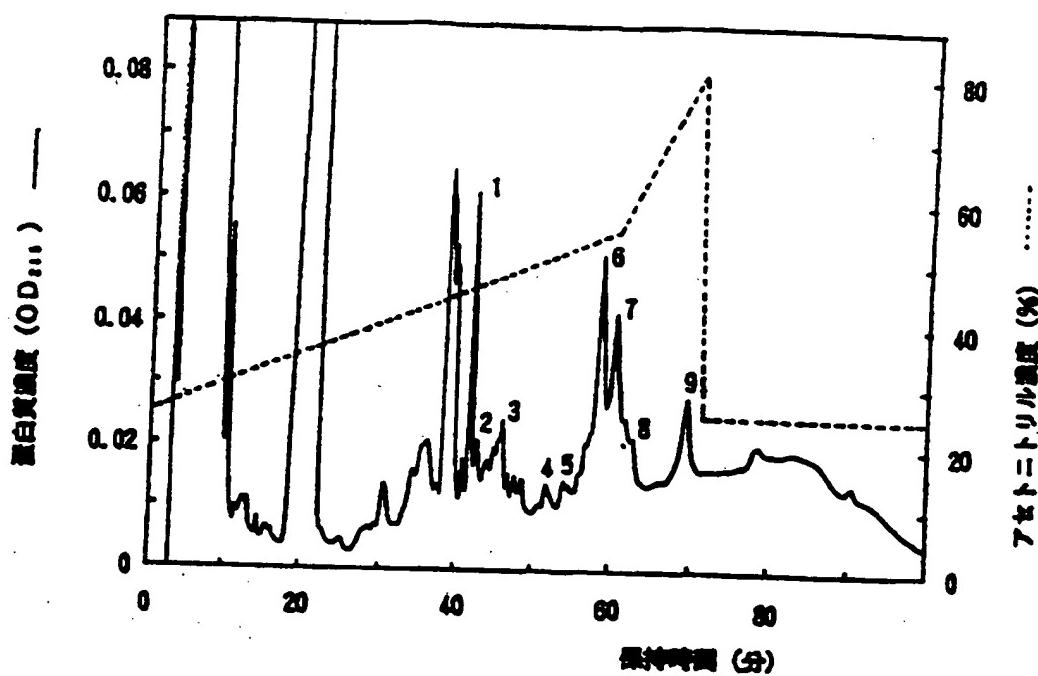


OCT/F活性	各段
1/100	-
1/500	-

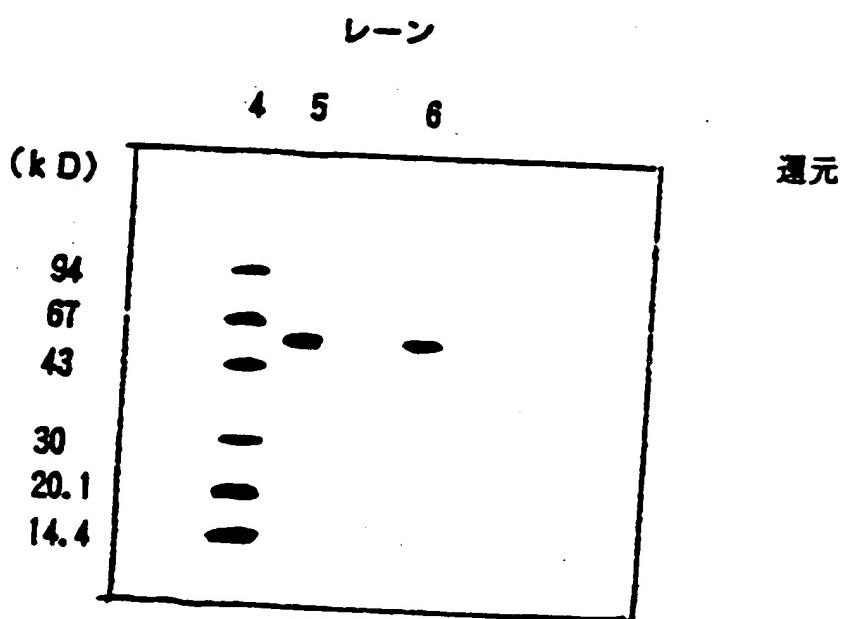
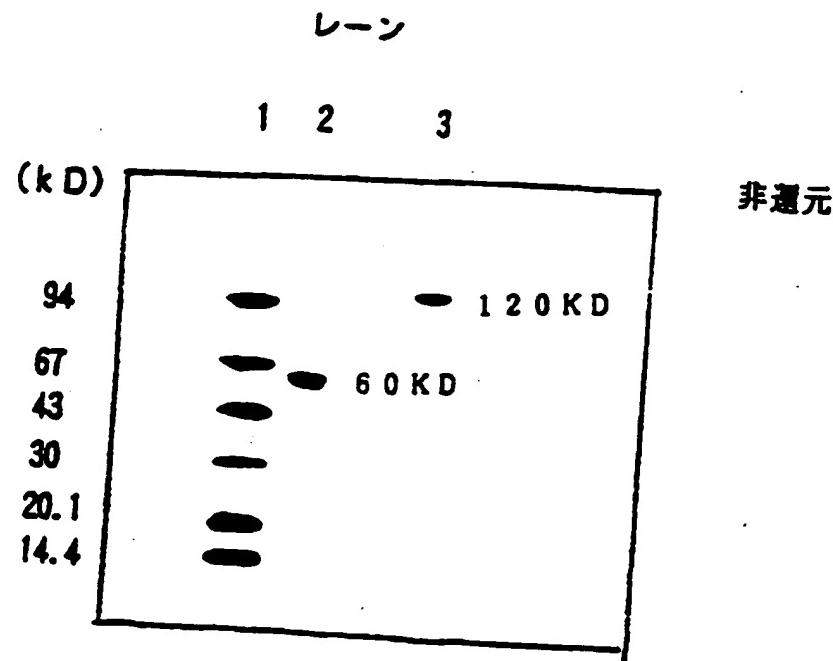
【図2】



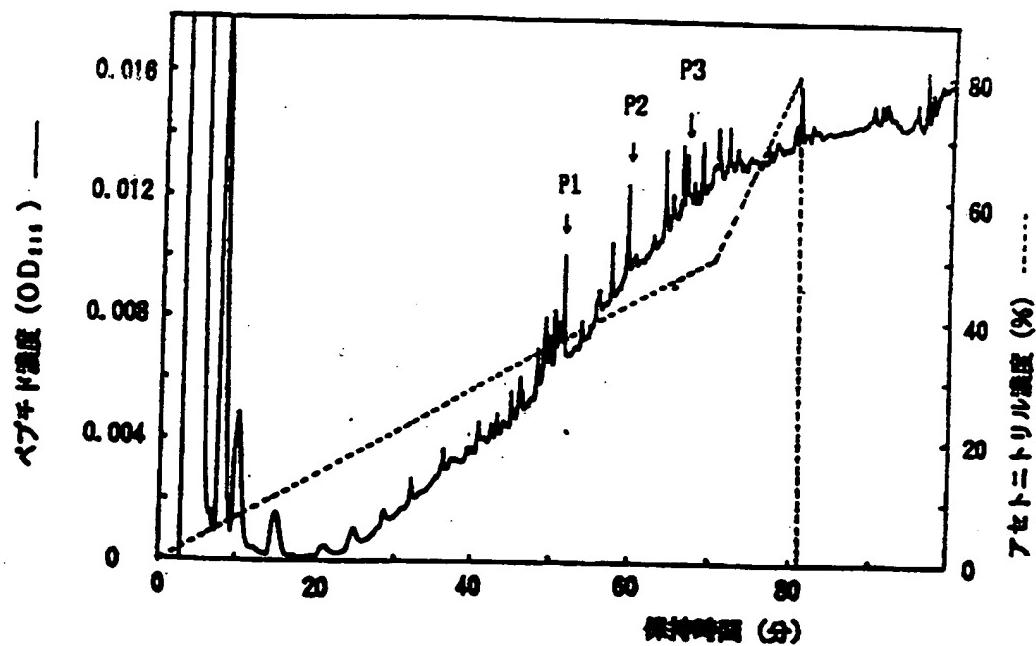
【図3】



【図4】



【図5】



【類名】 要約

【要約】

【構成】 次の物理化学的性質をもつ破骨細胞の分化・成熟抑制活性のある蛋白質。

(a) 分子量 (SDS-PAGEによる) ; 約60kD (還元条件下)、約60kD及び約120kD (非還元条件下)

(b) 親和性; 陽イオン交換体及びヘパリンに対して親和性を示す。

(c) 熱安定性; 70°C、10分間または56°C、30分間の熱処理により活性が低下し、90°C、10分間の加熱処理により活性が失なわれる。

(d) アミノ酸配列; 内部アミノ酸配列として配列表 配列番号1~3のアミノ酸配列をもつ。

ヒト線維芽細胞の培養液をイオン交換カラム、ヘパリンカラム、アフィニティーカラム及び逆相カラムで処理して吸着及び溶出をくり返して精製を行なう破骨細胞形成抑制蛋白質の製造法。この蛋白質は遺伝子工学的手法によっても生産される。

【効果】 骨粗鬆症等各種の骨量減少性疾患の治療剤あるいは生化学的試薬として有用である。

【選択図】 なし

【類名】 機構訂正データ  
 【訂正書類】 特許願

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】 000006699

【住所又は居所】 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

雪印乳業株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100090941

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階

藤野・児玉特許事務所

藤野 清也

申請人

【識別番号】 100105061

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階

藤野・児玉特許事務所

児玉 喜博

## 【提出された物件の記事】

【提出物件名】 受託証 1

書式 7

## 受 託 証

通知番号：7生寄文第 978号

通知年月日：平成 7年 6月 21日

富田研究所株式会社 生物科学研究所  
所長 竹下 保輔

殿

工業技術院生命工学工業技術研究所

大石達夫(署名)



## I. 微生物の表示

(受託者が付した識別のための表示)

DBK/01P10

(受託番号)

PERM P- 14998

## II. 科学的性質及び分類学上の位置

I種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

 科学的性質 分類学上の位置

## III. 受領及び受託

当所は、平成 7年 6月 21日に受領した I種の微生物を受託する。

出願人履歴情報

識別番号 [000006699]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

氏 名 雪印乳業株式会社